



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

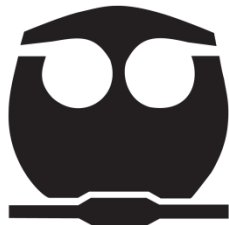
**VALIDACIÓN DE PETRIFILM™ EN MATRICES LÁCTEAS
PRODUCIDAS EN MÉXICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

ITZUMI SINAHÍ RAMÍREZ LIMA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **PROFESOR: OLGA DEL CARMEN VELÁZQUEZ MADRAZO**

VOCAL: **PROFESOR: AURORA IRMA ORTEGÓN ÁVILA**

SECRETARIO: **PROFESOR: AGUSTÍN REYO HERRERA**

1er. SUPLENTE: **PROFESOR: NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA**

2° SUPLENTE: **PROFESOR: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**FACULTAD DE QUÍMICA U.N.A.M.,
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS**

ASESOR DEL TEMA:

Olga del Carmen Velázquez Madrazo

SUPERVISOR TÉCNICO:

Alejandro Camacho Cruz

SUSTENTANTE:

Itzumi Sinahí Ramírez Lima

“La facilidad nunca fue la base del progreso”

Dallin H. Oaks

*“Nuestra labor en esta vida no es el ir por
delante de los demás, sino el ir por delante de nosotros mismos.”*

Thomas S. Monson

Dedicatorias y agradecimientos

A mi Padre Celestial por darme los medios necesarios para progresar aquí en la tierra.

A mis Padres, Raúl Ramírez y Ma. de Lourdes Lima, por educarme dentro del amor y la rectitud, por proveerme todo lo que he necesitado, tanto material como espiritual, por enseñarnos a amarnos y a servirnos los unos a los otros, por hacer todo lo posible para que pudiera concluir con mis estudios universitarios, por ponerme junto con mis hermanas en primer lugar en sus decisiones...

Agradecimientos

He concluido uno de los tantos caminos que hay que recorrer por la vida, el cual no fue nada fácil pues la facilidad nunca ha sido la base del progreso sin embargo me siento feliz por cada tropiezo y cada logro que obtuve a lo largo de mi preparación académica con la finalidad de poder terminar una carrera profesional y así estar preparada para las situaciones que puedan presentarse a lo largo de mi vida y después de ella...

A mis amigos de primer semestre: Viri, “Pachón” (Fernando), Ceci, Víctor por hacerme divertidos los días que estaba estresada, triste y por hacer más alegres mis días. Por hacerme recordar mi niñez cuando en las horas libres jugábamos a las escondidas, gallinita ciega, “las traes”, quemados. Por ser los primeros en convencerme a no entrar a mis clases.

A Javier por darme siempre de su tiempo, aun cuando estuviera muy estresado, y por tenerme tanta paciencia para enseñarme lo que no entendía de las materias y hacerme recordar cosas de la escuela que se me olvidaban. Por compartir momentos de alegría, tristeza, por estar siempre pendiente de mí...

A “muñe” (Angélica Pacheco), mi súper amiga, que también me tuvo muchísima paciencia y dedicó de su tiempo para enseñarme los temas de las materias que no entendía. Porque aunque ya no nos veíamos muy seguido pero cuando teníamos la oportunidad de hacerlo siempre me animaba para seguir adelante en la carrera y decirme que soy capaz de hacer muchas cosas. Por llevarme a “Cardio” para hacer mi servicio social y que aunque entrábamos súper temprana y salíamos súper tarde me ha servido mucho todo lo que ahí aprendí.

A Eli por hacerme los días divertidos en “Cardio” y animarme cuando no tenía ganas de ir al servicio y cuando nos hacía enojar o nos regañaba Jasso y por escucharme cuando me sentía triste.

A “Berni” (Bernardo) por hacerme súper divertidas las clases en la que fuimos juntos, por hacerme reír en todo momento (y más cuando hablaba como “el Gerber”), por ser mi compañía en la biblio para estudiar, hacer las tareas y exposiciones, sobre todo cuando llevamos Análítica Experimental II que nos quedábamos los viernes hasta que nos corrieran de la “biblio” para resolver las series de la maestra. Por esperarme en la noche cuando salía de Laboratorio de Alimentos I y darme “aventón” al metro Viaducto.

A mis hermanas Tere y Limara por despertarme cuando me quedaba dormida en la compu haciendo mis reportes de las prácticas o cuando estaba estudiando para mis exámenes y por ayudarme siempre en todo lo que he necesitado.

A mi Tutora de Tesis, la profesora Olga Velázquez, que me dio la oportunidad de realizar mi tesis en el área que me gusta (microbiología de alimentos), por brindarme las facilidades para llevarla a cabo, por su disposición para esperarme hasta tarde para terminar la parte experimental, por confiar en mí y enseñarme más allá de lo relacionado con mi tesis.

Finalmente a Ricardo A. Hdez. por ser mi compañía en los últimos semestres de la carrera en todo momento y en todo lugar, por los desvelos en el messenger para terminar los trabajos y estudiar para los exámenes, por ser mi fuerza cuando he estado débil, por ser mi voz cuando no he podido hablar, por ser mis ojos cuando no he podido ver, porque me ha levantado cuando no he podido hacerlo, porque ha visto lo mejor que hay en mí, por toda la alegría que ha traído a mi vida...

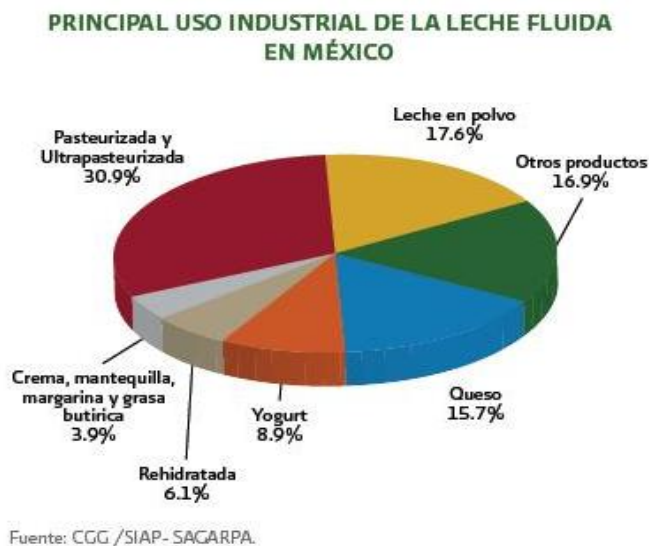
Índice

Resumen.....	i
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1 Validación en métodos microbiológicos.....	3
2.2 Productos lácteos.....	6
2.3 Microorganismos indicadores.....	8
2.3.1 Mesófilos aerobios.....	10
2.3.2 Cuenta de coliformes totales.....	11
2.3.3 Cuenta de hongos y levaduras.....	11
2.4 Placas Petrifilm™.....	13
2.4.1 Placas para recuento de Aerobios o Petrifilm™ AC.....	14
2.4.2 Placas para recuento de Coliformes o Petrifilm™ CC.....	15
2.4.3 Placas para recuento de hongos y levaduras o Petrifilm™ YM.....	15
3. Objetivos.....	16
3.1 Objetivo general.....	16
3.2 Objetivos particulares.....	16
4. Hipótesis.....	17
4.1 Hipótesis general.....	17
4.2 Hipótesis particulares.....	17

5. Metodología.....	18
5.1 Caracterización microbiológica de productos comerciales.....	18
5.2 Validación de Petrifilm™.....	20
5.3 Estandarización de los inóculos.....	21
5.4 Determinación de mesófilos aerobios y coliformes totales.....	24
5.5 Determinación de hongos y levaduras.....	26
6. Prueba de hipótesis estadística.....	28
7. Resultados y análisis.....	30
7.1 Ajuste de pH en las muestras comerciales.....	30
7.2 Caracterización microbiológica de productos comerciales.....	30
7.3 Validación de placas Petrifilm™.....	34
7.3.1 Queso Panela.....	35
7.3.2 Queso Oaxaca.....	40
7.3.3 Crema ácida.....	43
7.3.4 Arroz con leche.....	47
7.4 Resumen análisis estadístico.....	51
8. Conclusiones.....	52
9. Bibliografía.....	53
10. Anexos.....	58

Resumen

Cada año se producen millones de litros de leche bovina que son consumidos ya sea como producto final o como materia prima para productos procesados, de los cuales el destino de la leche fluida en México se distribuye de la siguiente forma: 30.9% para la elaboración de leche pasteurizada, homogeneizada y ultrapasteurizada; 17.6% para leche entera y leche para lactantes; 15.7% para quesos industriales; 9 % para yogurt natural o con frutas; 6 % para la rehidratación de leche; 4% para crema, mantequilla, margarinas y grasas butíricas; y se destina cerca de un 17% para otros productos entre los que destacan quesos artesanales, dulces, y otros productos lácteos de carácter regional (SAGARPA,2010).



Dichos productos deben cumplir con ciertos parámetros microbiológicos para garantizar su inocuidad y para evitar el deterioro de los mismos; por ello es muy importante contar con metodología confiable para llevar a cabo los análisis que permitan comprobar la calidad microbiológica de los productos alimenticios. Aunado a ello, la creciente demanda y competencia en el mercado requiere que los métodos de análisis microbiológico sean confiables, al menos tan confiables como los métodos tradicionales y que además faciliten el trabajo colateral que implican los análisis, como la preparación de medios de cultivo, eliminación de medios usados y la confirmación de resultados, entre otros.

Por ello es que se han desarrollado métodos alternativos que en uno o varios modos, faciliten el trabajo del analista microbiológico en la empresa alimentaria.

Uno de los métodos alternativos, propuesto para su uso en la industria son las placas Petrifilm™ producidas por 3M, que vienen listas para usarse, no requieren preparativos y facilitan la interpretación y la estandarización. Sin embargo, es necesario validarlas para las matrices particulares frente a métodos de referencia, ya que la matriz alimentaria puede influir significativamente en los resultados.

El objetivo del presente trabajo fue validar las placas ya mencionadas para la detección de los principales indicadores; mesófilos aerobios, coliformes totales y hongos y levaduras, frente a los métodos tradicionales descritos en las NOM's, en matrices lácteas producidas en México: queso panela, queso Oaxaca, crema ácida y arroz con leche, todos marca Lala.

Para ello se hicieron las determinaciones en cuestión por ambos métodos, en muestras comerciales y en muestras inoculadas con poblaciones microbianas conocidas; estos datos se analizaron estadísticamente mediante la prueba t-Student, para determinar si hay diferencia significativa entre ambos métodos.

Finalmente se encontró que existe una mejor recuperación con el método Petrifilm™ para mesófilos aerobios en crema ácida y para hongos y levaduras en los cuatro productos (queso Panela, queso Oaxaca, crema ácida y arroz con leche).

1. Introducción

Los productos lácteos forman parte importante de la alimentación de las personas de todas las edades, porque aportan nutrientes importantes para el organismo, en especial proteína de origen animal y excelente valor biológico (caseína), calcio, vitaminas A, B, D y E y en algunas ocasiones, otros nutrientes o componentes funcionales, como los probióticos. Además, los lácteos forman parte de otros platillos o acompañan a otros alimentos confiriéndoles un mejor sabor y finalmente, porque satisfacen nuestros antojos.

Por todo ello, los lácteos son productos de alto consumo y, en general, son perecederos, lo que hace que las industrias que los producen tengan que realizar un gran número de análisis a lo largo de su producción y que se necesiten resultados de fácil interpretación y confiables para asegurar la inocuidad y calidad, establecer la vida de anaquel, prevenir su deterioro y verificar que los productos cumplan con la normatividad aplicable.

Entre los análisis que la industria láctea tiene que llevar a cabo, algunos de los más laboriosos son los microbiológicos. Por eso han surgido algunos métodos que facilitan el trabajo, la interpretación y la estandarización de los análisis microbiológicos; entre ellos destacan las placas 3M™ Petrifilm™, que cuentan con aprobaciones de organismos internacionales, como AOAC, AFNOR y COFOCALEC (3M México, 2006). Sin embargo, es muy importante validar cualquier método nuevo cuando se aplica a productos diferentes, especialmente en el caso de alimentos, que son matrices tan complejas y con alta probabilidad de interacción durante el análisis (Barembuem, 2003).

Este trabajo consiste en la validación de placas 3M™ Petrifilm™ para la detección de microorganismos indicadores: mesófilos aerobios, coliformes totales y hongos y levaduras, en matrices de lácteos procesados industrialmente y que son ampliamente consumidos en México: queso Oaxaca, queso Panela, crema ácida

y arroz con leche. Se inicia por explicar qué es validación, qué pasos son necesarios para realizarla y qué aspectos se tienen que considerar para establecer si este método puede aplicarse de manera confiable en la industria mexicana, sin diferencias significativas respecto a los métodos oficiales para dichas determinaciones.

2. Marco teórico

2.1 Validación en métodos microbiológicos

El análisis microbiológico de los alimentos es un requisito indispensable para garantizar la inocuidad en la cadena alimentaria, es por ello que existen métodos estandarizados que son considerados como métodos analíticos de referencia para el análisis de alimentos (Jasson, 2010).

Hoy en día se cuenta con varios métodos alternativos o métodos rápidos, desarrollados para facilitar los análisis, realizarlos y/o interpretarlos con mayor facilidad y confiabilidad en los resultados. Estos métodos, en general tratan de superar alguna o varias de las dificultades de los métodos tradicionales: trabajo previo, tiempo de obtención de resultados, estandarización, dificultades en la interpretación, principalmente (Ortega, 2010).

Un método rápido se puede definir como cualquier método o sistema que reduce el tiempo necesario para obtener un resultado de la prueba microbiológica. La palabra *rápido* puede ser interpretada como un menor tiempo de detección, pero también puede referirse a un mayor flujo en el manejo de múltiples muestras; sin embargo su interpretación depende de las necesidades del laboratorio (Jasson, 2010).

Para que estos métodos puedan ser usados de manera confiable es necesario demostrar su fiabilidad y la equivalencia en relación con los métodos tradicionales existentes, llevando a cabo una validación.

Se entiende por validación al proceso mediante el cual se puede demostrar que los resultados producidos por un procedimiento analítico son fiables y reproducibles, y que se ajustan al propósito para el que fue desarrollado (Kellner, 1998).

La validación tiene diferentes requisitos, según el tipo de método analítico a que se aplique.

Los *métodos cualitativos* son métodos de análisis cuya respuesta es la presencia o ausencia del analito en cierta cantidad de muestra. Para validarlos, es importante determinar su repetibilidad, reproducibilidad, especificidad, sensibilidad y límites de detección (NordVal, 2009; Jasson, 2010; Ortega, 2010).

Los *métodos cuantitativos*: son métodos de análisis cuya respuesta es la cantidad de analito medido en determinada cantidad de muestra. En la validación de éstos, es importante tomar en cuenta exactitud, sensibilidad, especificidad, repetibilidad, reproducibilidad y límite de cuantificación (NordVal, 2009).

Tabla 1. Aspectos generales a considerar en una validación
Método

Aspectos a considerar	Cualitativo	Cuantitativo
	Límite de detección	Límite de cuantificación
Sensibilidad	Sensibilidad	
Especificidad	Especificidad	
Repetibilidad	Repetibilidad	
Reproducibilidad	Reproducibilidad	
	Exactitud	

Fuente: Cuesta, A., 2010.

En términos generales, la validación se puede llevar a cabo en dos formas, independientemente del tipo de método; y son las siguientes:

- a) “Validación en un laboratorio” (*Single laboratory validation ó In-house validation*). Consiste en la comparación del método alternativo contra el método de referencia. Este tipo de validación tiene como objetivo principal reunir toda la información posible respecto al nuevo método: objeto de estudio, la enumeración del microorganismo objetivo, rangos de concentraciones en los que se obtienen los resultados satisfactorios, la

selectividad, especificidad e incertidumbre. Además se pueden analizar los requerimientos del método, como tiempo, temperatura de incubación, condiciones de almacenamiento, entre otros (Álvarez, 2009; NordVal, 2009; Ortega, 2010).

- b) “Validación colaborativa” (*Collaborative Study*) que, como su nombre lo indica, consiste en un estudio colaborativo entre varios laboratorios, cuyo propósito es proveer un estimado real de los atributos esperados, cuando el método sea utilizado en la práctica diaria, y establecer si el nuevo método satisface realmente las necesidades del sector o la comunidad en donde funcionan los laboratorios (Álvarez, 2009; Jasson, 2010; Ortega, 2010).

En general, los organismos internacionales que tienen funciones de estandarización, normatividad, coordinación y actualización sectorial, son muy activos en la validación de nuevas metodologías. En el campo de los alimentos, destacan *AOAC International* (Association of Official Analytical Chemists International), NordVal (part of the Nordic Committee on Food Analysis, Norway), MicroVal (European Validation and Certification Organization, Europe). En México destaca COFOCALEC (Consejo para el fomento de la calidad de la leche y sus derivados), en el campo de los productos lácteos.

En el presente trabajo se validarán las Placas 3M™ Petrifilm™, en matrices lácteas, frente a los métodos tradicionales, descritos en las NOM's, para la detección de los principales grupos de microorganismos indicadores.

2.2 Productos lácteos

Se define como productos lácteos a aquellos alimentos obtenidos a partir de la leche; pueden contener aditivos alimentarios, coadyuvantes de elaboración u otros ingredientes funcionalmente necesarios para el proceso de fabricación (FAO, 1999). Al ser elaborados a partir de la leche, como ingrediente principal, constituyen productos sumamente nutritivos, que por lo tanto están expuestos a deterioro microbiano y que pueden ser vehículo de microorganismos patógenos, principalmente causantes de ETA's (enfermedades transmitidas por alimentos). Desde luego, en el caso de cada producto es necesario identificar los puntos en los cuales se pueden eliminar los riesgos para el consumidor (Stabel, 2003, Goff, 2006).

Desde la obtención de la materia prima, es muy importante tomar en cuenta la higiene y sanitización de los ordeñadores, baldes y demás componentes del sistema, ya que éstos son los principales factores responsables del aumento de la carga microbiana en la leche durante la ordeña (Ruegg, 2003; De los Reyes, 2010).

En condiciones ideales de ordeña higiénica, el recuento total bacteriano inicial de la leche cruda se encuentra en torno de 1000 a 9000 UFC/ mL (De los Reyes, 2010). Después de la ordeña, los principales factores responsables del aumento en la población microbiana incluyen la temperatura de almacenamiento del producto y el tiempo transcurrido hasta su proceso industrial; especialmente en la industria láctea hay que recordar siempre que la leche es un alimento altamente nutritivo, ideal para el crecimiento de microorganismos, incluyendo los patógenos que pueden provenir de la leche, de los operadores e incluso del ambiente (Ruegg, 2003).

La pasteurización es un método de tratamiento térmico moderado (63°C / no menos de 30 min ó bien a 72°C / no menos de 16 s) (NOM -091-SSA1-1994; Goff, 2011). Es eficaz para reducir varios ciclos logarítmicos de los microorganismos patógenos que pueden estar en la leche, gracias a lo cual se puede garantizar la

inocuidad de los productos lácteos. El tratamiento, además destruye gran parte de la microbiota nativa con lo cual prolonga la vida de anaquel del producto (Stabel, 2002; Ruegg, 2003). Las legislaciones de la mayor parte de los países exigen actualmente que la leche sea pasteurizada y también aplican esta especificación a la mayoría de los lácteos, con excepción de algunos en los cuales se ha demostrado que el resto del proceso a que se someten, contribuye a su inocuidad (Stabel, 2003).

Pero también se han presentado casos de brotes de enfermedades derivadas de productos lácteos en los que se ha utilizado leche pasteurizada. En la mayoría de los casos, al establecer las causas de esto, se ha encontrado que se deben principalmente a fallas durante el proceso de pasteurización o a contaminación después de la pasteurización, es decir, post-proceso (Stabel, 2002; Ruegg, 2003; Goff y Griffiths, 2006), lo que incluye inadecuada manipulación del producto, falta de higiene y sanitización del equipo y utensilios a utilizar para su elaboración o higiene deficiente en el personal de producción, entre otros. Por todo ello, es necesario llevar a cabo análisis en los alimentos, unos de ellos son los análisis microbiológicos (Ray y Bhunia, 2010).

El análisis microbiológico de los productos lácteos es una herramienta importante en la industria alimentaria ya que la determinación cualitativa y sobre todo, cuantitativa de microorganismos en este tipo de alimentos procesados, se relaciona con los atributos generales de la calidad de ese alimento, con el tratamiento al que ha sido sometido y su eficiencia, además de proporcionar una idea clara de las condiciones en que ha sido manipulado, de su estado de conservación y de otras circunstancias importantes para su inocuidad, calidad y estabilidad (Jay, 1992; Alonso y Poveda, 2008).

Dentro de los principales objetivos de los análisis microbiológicos están (Alonso y Poveda, 2008):

- ✓ Asegurar que el alimento cumpla con las normas requeridas para el producto específico.
- ✓ Verificar que los análisis microbiológicos se ajusten a normas internas establecidas por la empresa que los procesa y a las que exige el consumidor.
- ✓ Comprobar que las materias alimenticias que llegan a la planta para ser procesadas, cumplen con las normas exigidas y pactadas con el productor.
- ✓ Controlar el proceso y la higiene en la línea de fabricación.

En nuestro país se han desarrollado Normas Oficiales Mexicanas (NOM) que son de carácter obligatorio a nivel nacional. Éstas contienen la información, requisitos, especificaciones y metodología que deben cumplir los productos o servicios a los que se refieren, para su comercialización en el país (PROFECO, 2011).

En las normas de alimentos generalmente hay especificaciones sanitarias que incluyen algunos parámetros microbiológicos. Éstos se establecen a partir de un análisis de riesgos y pueden referirse a microorganismos “indicadores” o directamente a patógenos.

2.3 Microorganismos indicadores

Cuando se trata de analizar y sobre todo, tener control de la población microbiana, la detección de microorganismos indicadores para evaluar la calidad sanitaria o microbiológica de un producto o ambiente, es un enfoque alternativo que resuelve las principales dificultades de detección de patógenos tales como el tiempo, el costo y la confiabilidad, y con un buen margen de seguridad; ya que la recuperación de indicadores es más eficiente y su presencia en circunstancias de riesgo es más constante (Sobsey, 2008).

Como se ha mencionado, el empleo de microorganismos indicadores se basa en que su enumeración se realiza con mayor facilidad y en la certeza de que su presencia en los alimentos (en determinado número), indica que estos productos estuvieron expuestos a condiciones que permitieron:

- Introducción de organismos peligrosos
- multiplicación de especies patógenas
- fallas en los tratamientos de reducción o eliminación de microorganismos.

Y en cualquiera de los casos, existen riesgos para el consumidor. (UP de Navarra, 2009).

La detección de indicadores es preferible al análisis directo de patógenos porque la frecuencia de estos últimos puede ser menor o su determinación incierta; por ejemplo, algunas especies pueden ser fermentadoras lentas como es el de caso de *Yersinia sp.* o cepas no fermentadoras como *Salmonella sp.* Detectar a los indicadores permite un enfoque de prevención de riesgos, puesto que advierten manejo inadecuado y/o contaminación.

Los principales microorganismos indicadores en alimentos son:

-Indicadores de condiciones de manejo o de eficiencia de proceso:

- Mesófilos aerobios o cuenta total
- Cuenta de coliformes totales
- Cuenta de hongos y levaduras.

-Indicadores de contaminación fecal

- Coliformes fecales
- *E. coli*
- Enterococos
- *Clostridium perfringens*

En la industria de alimentos, los más importantes son los indicadores del primer grupo, es decir los que advierten sobre condiciones de manejo y/o eficiencia de los procesos.

2.3.1 Mesófilos aerobios o cuenta total

Este es un grupo de microorganismos muy heterogéneo, pues incluye a todas las bacterias que en aerobiosis pueden formar colonias visibles, bajo las condiciones del ensayo, es decir a temperaturas de 35 – 37°C que son óptimas para los mesófilos. Es evidente que varios de los microorganismos patógenos caen en este grupo. Por ello, detectar a los mesófilos aerobios nos puede dar idea de la posibilidad que han tenido los microorganismos patógenos para sobrevivir y/o crecer en ese producto (Caballero, 2008).

La mayoría de los alimentos industrializados y/o listos para el consumo, deben ser considerados como inaceptables, cuando tienen gran número de microorganismos mesófilos, aun cuando no hayan alterado de forma apreciable los caracteres organolépticos del alimento.

Un recuento elevado, según el tipo de alimento, podría indicar:

- Materia prima contaminada.
- Tratamientos no satisfactorios desde el punto de vista sanitario.
- Condiciones inadecuadas de tiempo y temperatura durante el almacenamiento.
- Posibilidad de que existan patógenos pues éstos son mesófilos y se dieron condiciones favorables para su multiplicación (Caballero, 2008).

Desde luego, los alimentos fermentados son una excepción a esta regla puesto que la mayoría de los microorganismos involucrados en la fermentación también pueden crecer en estas condiciones.

Para la detección de mesófilos aerobios, la “Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa”, establece el fundamento de la técnica, que consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, suponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio.

2.3.2 Cuenta de coliformes totales

Las bacterias del grupo coliforme se definen como: bacilos cortos, Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con formación de gas dentro de las 48 h a 35°C; algunas fermentan la lactosa lentamente. Durante mucho tiempo se consideraron evidencia de contaminación fecal, pero se ha demostrado que muchos de ellos pueden vivir e incluso crecer en el suelo, el agua y otros ambientes (Camacho *et al.*, 2009).

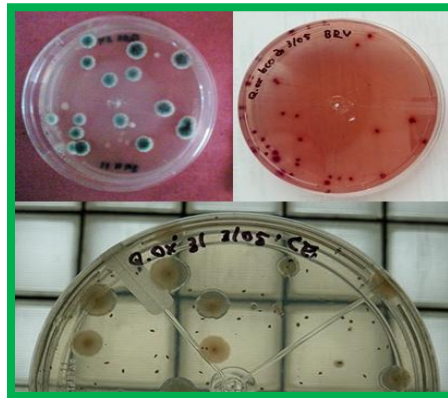
Se consideran un excelente indicador de la eficiencia de los procesos de sanitización y desinfección, así como de calidad sanitaria de agua, vegetales y diversos productos procesados. Además un número elevado de coliformes puede estar relacionado con posible presencia de algunos patógenos.

Su determinación se basa generalmente en la capacidad de fermentar la lactosa. Para la detección de este se utiliza el método descrito en la “Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa”. Este método se fundamenta en determinar el número de microorganismos coliformes presentes en la muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35°C en 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares.

2.3.3 Cuenta de hongos y levaduras.

Este grupo posee características muy diferentes a los dos grupos anteriores ya que tienen un crecimiento muy lento además de que se manifiestan en donde las condiciones no favorecen el crecimiento bacteriano como: baja humedad, baja temperatura de almacenamiento, pH ácido, alto contenido en sales o carbohidratos. También son un indicador útil para evidenciar grado general de contaminación en alimentos en los cuales no son útiles los mesófilos aerobios, como en alimentos fermentados. Finalmente, indican el riesgo de desarrollo de hongos toxigénicos en los alimentos en los que se encuentran (Camacho *et al.*, 2009).

Para la detección de este grupo, la “Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos” describe el método que se basa en inocular una cantidad conocida de la muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH 3,5 e incubado a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.



Método tradicional

Si bien los métodos descritos en las NOM referidas son los oficiales, llevarlos a cabo resulta laborioso, debido a la preparación del medio de cultivo ya que requiere de muchos materiales, aparatos y tiempo porque hay que pesar, hidratar, disolver y esterilizar los medios antes de usarlos. Además se requiere de un baño de agua de temperatura controlada y con circulación para conservar el agar fundido antes de verterlo en las cajas, y una vez vertido en las cajas Petri, se tiene que homogeneizar cuidadosamente el medio de cultivo con el inóculo y esperar a que solidifique antes de llevar a incubación (Torres, 1998). Todas estas operaciones son fuente de variaciones y por lo tanto de error.

Por ello, se han desarrollado métodos microbiológicos alternativos de fácil utilización que pueden resultar muy convenientes para la industria, sobre todo cuando se realizan cientos o miles de análisis en un día y cuando se aplican en laboratorios diferentes, por ejemplo en las diferentes plantas de una misma empresa.

Para que estos métodos alternativos puedan ser utilizados deben de cumplir los siguientes criterios:

- proporcionar resultados de manera rápida,
- ser adecuados para el análisis de rutina,
- ser precisos y exactos,
- ser técnicamente viables e
- internacionalmente aceptables (Jordano y Medina, 1999).

De acuerdo a lo anterior 3M ha desarrollado una línea de productos para este fin: las Placas Petrifilm™ que permiten ahorrar tiempo y mejorar productividad (3M, 2006), además de que han sido reconocidas por organizaciones internacionales como la *Association of Official Analytical Chemists International (AOAC)*), el Consejo para el fomento de la Calidad de la Leche y sus Derivados (COFOCALEC) que es una organización nacional, encargada de evaluar la calidad de la leche y sus derivados en el país, conforme a las Normas Mexicanas y Normas Oficiales Mexicanas aplicables. Gracias a su aceptación las placas 3M han sido incluidas entre los métodos establecidos para el control microbiológico de lácteos en la “NMX-F-717-COFOCALEC-2006. Sistema Producto Leche-Alimentos-Lácteos-Análisis Microbiológicos de Leche y Derivados-Métodos de Prueba Rápidos”.

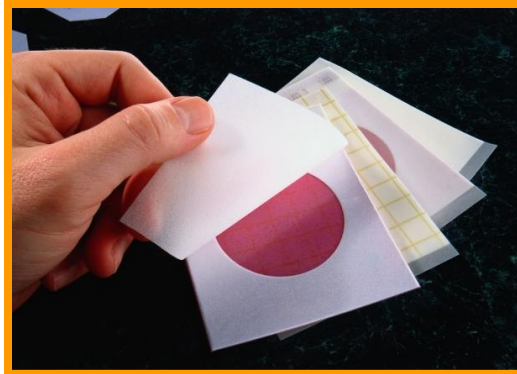
2.4 Placas Petrifilm™

La empresa 3M ha desarrollado diversos productos alternativos para análisis microbiológicos, incluyendo una línea de placas “listas para usar”, cuidadosamente estandarizadas y aplicable a Laboratorios Microbiológicos e Industrias de Alimentos que necesitan cubrir los riesgos de seguridad.

De manera general las placas Petrifilm™ constan de dos filmes o láminas de plástico. En ambos hay un medio de cultivo deshidratado, un indicador y un agente

gelificante en frío y soluble en agua. El medio de cultivo puede ser selectivo o no dependiendo del microorganismo en estudio y generalmente, de composición nutricia igual a la de los medios de cultivo empleados en los métodos oficiales. (3M, 2006).

El film superior es de plástico y además contiene un adhesivo. El film inferior consta de un papel cuadriculado que facilita el conteo de las colonias; ambos se hidratan con el volumen de agua con el cual se aplica la muestra y se adhieren al entrar en contacto, evitando la deshidratación del medio durante la incubación (3M, 1999; Alonso y Poveda 2008).



Placas Petrifilm™

Las placas Petrifilm usadas para este trabajo son:

- ✓ Placas para recuento de Aerobios o Petrifilm™ AC (*Aerobic Count*)
- ✓ Placas para recuento de Coliformes o Petrifilm™ CC (*Coliform Count*)
- ✓ Placas para recuento de hongos y levaduras o Petrifilm™ YM (*Yeast and Mold*)

2.4.1 Placas para recuento de Aerobios o Petrifilm™ AC

Son utilizadas para la enumeración de bacterias aeróbicas en la industria de alimentos y bebidas. Contiene medio de métodos estándar con indicador cloruro de tetrafenil tetrazolio (TTC) que facilita el recuento de las colonias confiriéndoles una coloración roja intensa. (3M, 2006)

2.4.2 Placas para recuento de Coliformes o Petrifilm™ CC

Contienen los nutrientes del Violeta Rojo Bilis (VRB) con el indicador cloruro de tetrafenil tetrazolio (TTC) que facilita la cuenta de colonias, dándoles una coloración roja intensa. En estas placas, el film superior atrapa el gas producido por los microorganismos, generando burbujas claramente perceptibles, para diferenciar a los fermentadores de lactosa (3M, 2005).

2.4.3 Placas para recuento de hongos y levaduras o Petrifilm™ YM

Se utilizan en la enumeración de la población de mohos y levaduras en productos, ambientes o superficies. Contiene nutrientes de “SABHI” (Dextrosa Sabouraud más infusión cerebro corazón) e incluye dos antibióticos: cloranfenicol y clorotetraciclina para inhibir desarrollo bacteriano. Como indicador, estas placas contienen BCIP. Esta placa, además de las condiciones selectivas, se fundamenta en la detección de fosfatasa, que al hidrolizar el indicador, tiñe las colonias de los hongos y las levaduras (Torres, 1998; 3M, 2004).

Dada la complejidad de las matrices alimentarias, aún con las ventajas y las aprobaciones por los organismos internacionales que presenta el método a validar, es importante verificar que dicho método genere resultados equivalentes o mejores, comparados con el método de referencia, para matrices específicas. Ese ha sido el propósito de este trabajo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

- Validar las Placas Petrifilm™ AC, Petrifilm™ CC y Petrifilm™ YM para la detección de indicadores: mesófilos aerobios, coliformes totales y hongos y levaduras respectivamente, en matrices lácteas producidas en México, frente a los métodos descritos en las NOM's para dichas determinaciones.

3.2 Objetivos particulares

- Reducir la carga de trabajo.
- Reducir la manipulación de equipos.
- Reducir el tiempo en el procedimiento para la detección de este tipo de indicadores microbiológicos.

4. Hipótesis

4.1 Hipótesis general

Si no existe diferencia estadísticamente significativa entre los métodos Petrifilm™ y los métodos tradicionales para la determinación de mesófilos aerobios, coliformes totales y hongos y levaduras, cuando se aplican a matrices de productos lácteos producidos en México, entonces éstas podrán utilizarse de manera confiable en la industria.

4.2 Hipótesis particulares

- Si no existe diferencia estadísticamente significativa entre el método Petrifilm™AC y el método tradicional para la detección de mesófilos aerobios entonces el método Petrifilm™AC podrá usarse de manera confiable en este tipo de indicadores microbiológicos en las unidades de prueba ensayada.
- Si no existe diferencia estadísticamente significativa entre el método Petrifilm™CC y el método tradicional para coliformes totales entonces el método Petrifilm™CC podrá usarse de manera confiable para la detección de este tipo de indicadores microbiológicos en las unidades de prueba ensayada.
- Si no existe diferencia estadísticamente significativa entre el método Petrifilm™YM y el método tradicional para hongos y levaduras entonces el método Petrifilm™YM podrá usarse de manera confiable para la detección de este tipo de indicadores microbiológicos en las unidades de prueba ensayada.

5. Metodología

Muestras.

Se utilizaron las siguientes matrices de lácteos producidos en México: crema ácida, queso panela, queso Oaxaca y el arroz con leche; fueron proporcionados por la empresa LALA.

Todos los productos se guardaron en refrigeración hasta utilizarlos para los análisis.

Primero se hicieron las determinaciones objeto de este estudio, en los productos comerciales, para establecer sus características, por ambos métodos.

5.1 Caracterización microbiológica de productos comerciales

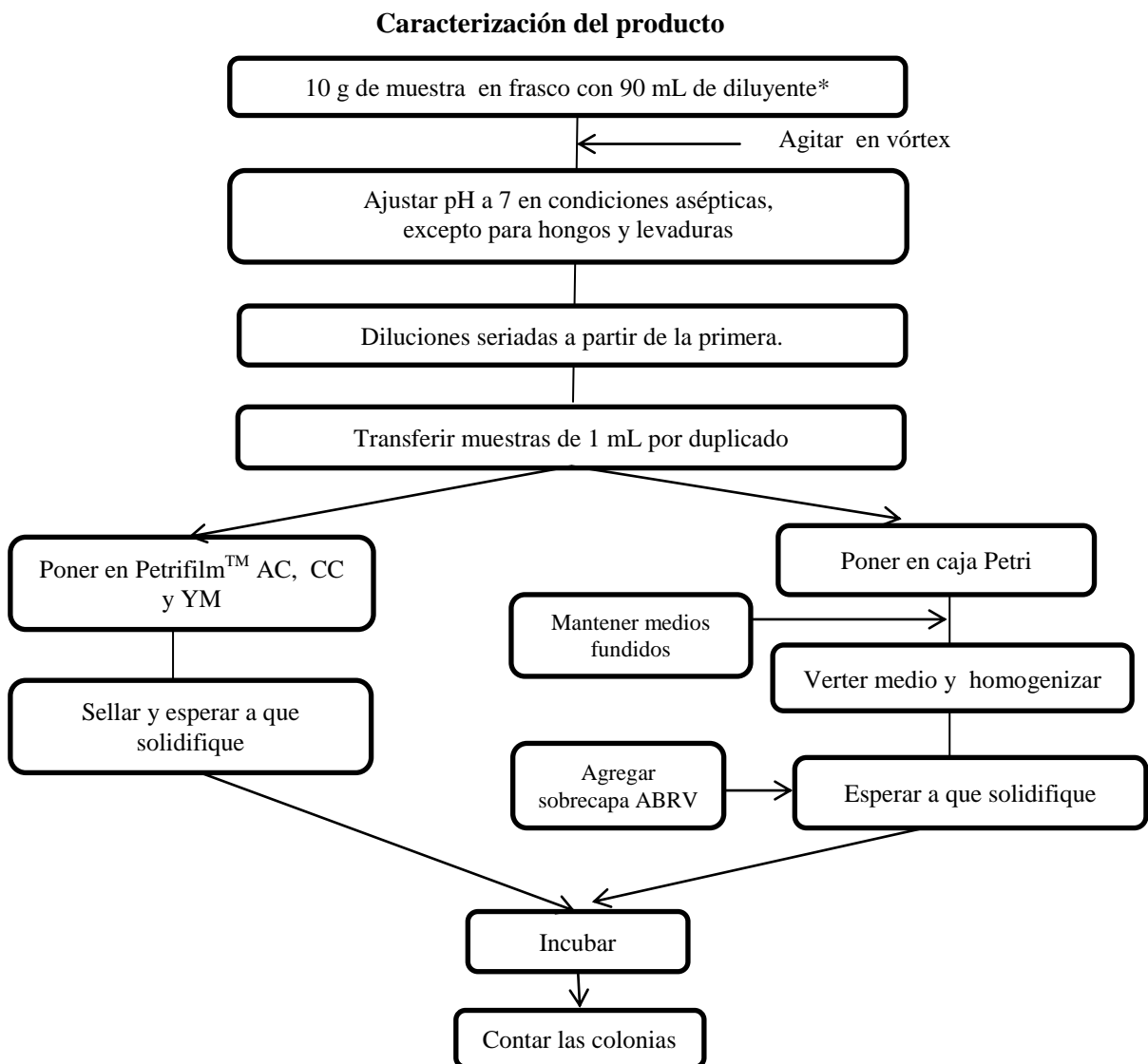
Se realizaron las determinaciones de mesófilos aerobios, coliformes totales y mohos y levaduras en los productos: Queso panela, Queso Oaxaca, crema ácida y arroz con leche, marca LALA. Las determinaciones se hicieron simultáneamente por Petrifilm™ y por Método Tradicional, es decir el especificado en la NOM respectiva (NOM-092-SSA1-1994, NOM-111-SSA1-1994 y NOM-113-SSA1-1994). Dado que el método Petrifilm™ es muy sensible al pH de la muestra, por el indicador que contienen las placas, es importante ajustar a pH entre 6.5 y 7.5 en las diluciones antes de inocular. Lo primero que se hizo fue estandarizar el ajuste de pH de las muestras; se probaron las siguientes opciones, para todas las muestras:

- Diluir en solución salina isotónica al 0.85% (SSI 0.85%) y ajuste de pH con NaOH 1N estéril; en este caso se estableció la cantidad necesaria midiendo con potenciómetro, de manera que al hacer los análisis se agregaba esta cantidad y sólo se verificaba con papel pH.
- Diluir directamente en buffer de fosfatos pH 7.3; aunque es más laborioso de preparar el buffer. Se recomienda cuando resulta difícil ajustar el pH a la muestra por efecto amortiguador de la propia matriz.

En ambos casos se midió el pH con un potenciómetro marca Hanna instruments HI98127, modelo pHep previamente calibrado con buffers de referencia marca Merck pH 7.0 y pH 4.0. También se verificó el pH de las siguientes diluciones decimales.

Esta precaución no es necesaria para la determinación de hongos y levaduras, sin embargo si este proceso ya ha sido realizado, igual se puede utilizar en la Placa Petrifilm™ YM (3M, 2004)

El siguiente esquema resume la caracterización microbiológica de las muestras:



Se determinaron mesófilos aerobios y coliformes totales a 37°C durante 48 h, tanto en Petrifilm™ como por método tradicional, todo por duplicado.

Para hongos y levaduras se sembró también por ambos métodos y por duplicado; las placas se contaron a los 3 días para levaduras y a los 5 días para hongos, incubando a 28°C.

A través de estas determinaciones se obtuvo información sobre la carga microbiana inicial y conformidad con las especificaciones microbiológicas establecidas en las normas aplicables para cada producto, antes de comparar los métodos de análisis.

5.2 Validación de Petrifilm™

Ya caracterizado el producto, se procedió a hacer el análisis con 30 muestras por cada producto utilizando solamente la primera dilución decimal e inoculando intencionalmente cada producto, debido a que las cuentas de los microorganismos bajo estudio en los productos comerciales son muy bajas. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por ambos métodos (tradicional y Petrifilm™) y por duplicado cada muestra.

Posteriormente se hizo un análisis estadístico mediante t-Student, para determinar si hay diferencias significativas entre ambos métodos.

Además para cada caso se corrieron

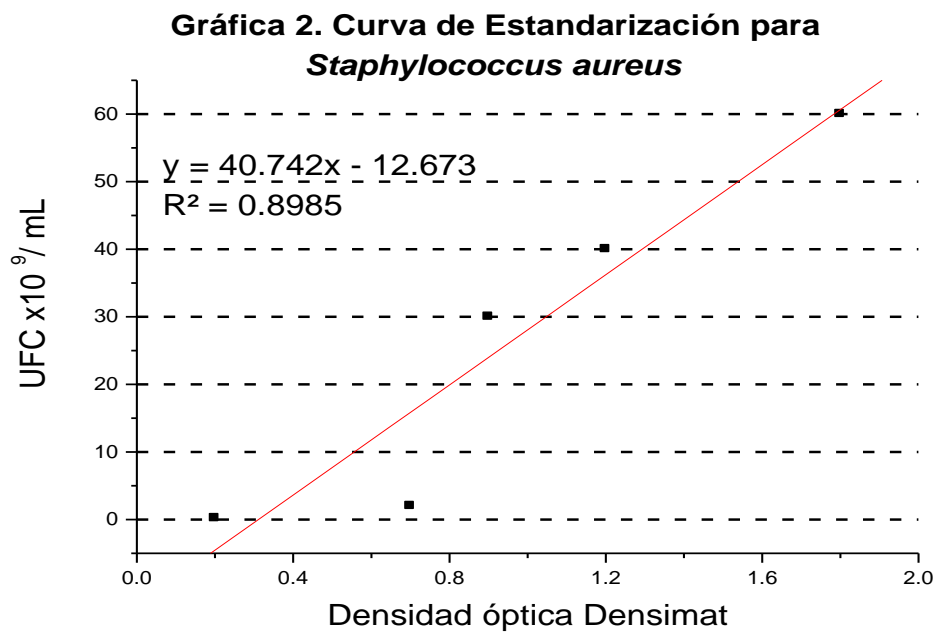
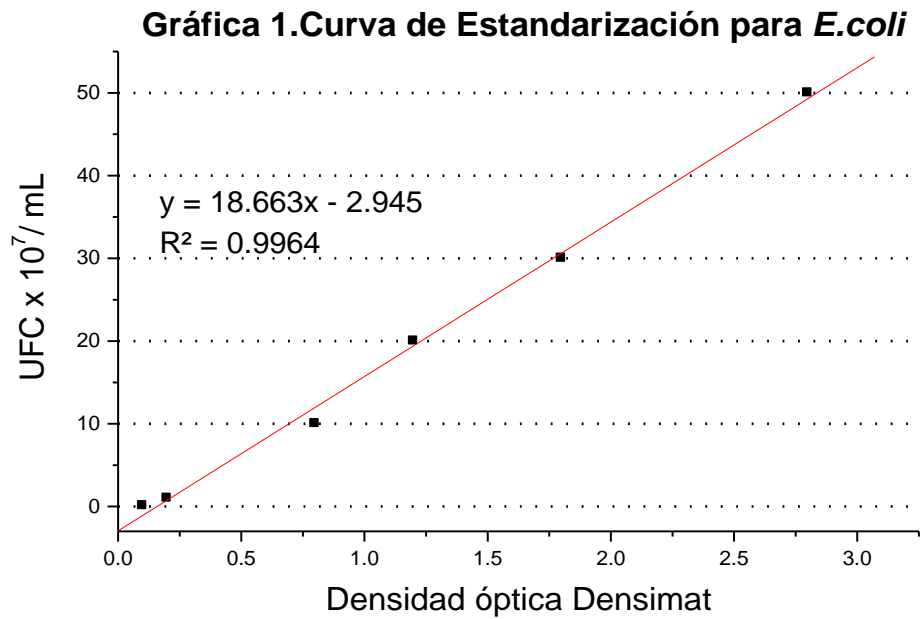
- Blancos: que contienen solamente a la matriz para determinar la carga inicial del alimento.
- Controles: los cuales contienen únicamente SSI con la misma cantidad de microorganismos de interés que se inocularon en la matriz para descartar el efecto de la matriz sobre el inóculo, además de que esto permite determinar la eficiencia de la recuperación.
- Medio de cultivo sin muestra y sin inóculo para verificar esterilidad.

5.3 Estandarización de los inóculos

Se utilizaron cultivos proporcionados por el Cepario de la Facultad de Química de la UNAM. Para la determinación de mesófilos aerobios, se emplearon *Escherichia coli* ATCC-1122 y *Staphylococcus aureus* ATCC-6538. Se empleó la misma cepa de *E. coli* para la determinación de coliformes.

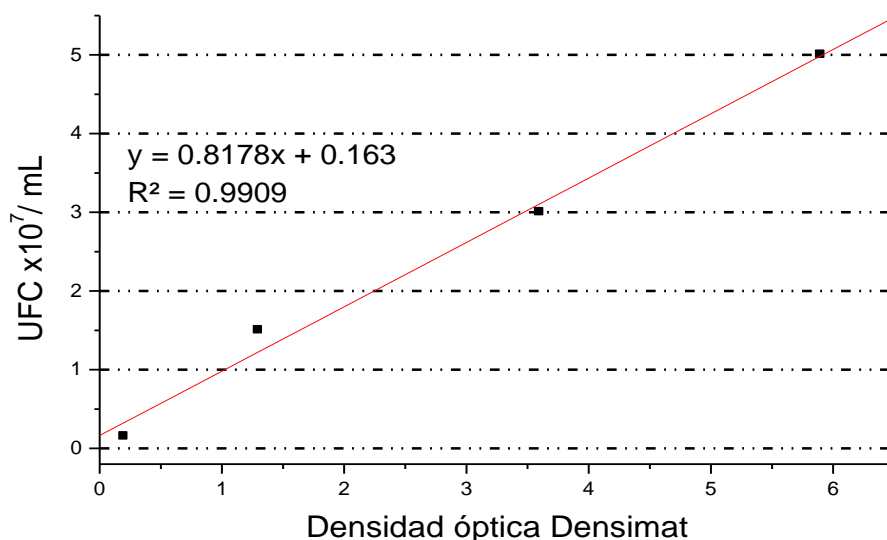
Para determinar levaduras se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* (CFQ-L-25) y para hongos *Penicillium sp* (CFQ-H-75).

Para las bacterias, los cálculos se hicieron para inocular entre 60 y 120 UFC/g. Primero se cultivaron las cepas en caldo BHI por 24 h a 37 °C. Se realizó una dilución 1:5 de cada cepa en SSI en tubos de 75x100 mm con tapón de rosca, mezclando con vórtex y se estimó la población mediante densidad óptica por medio del Densimat de *BioMerieux* e interpolando a Unidades Formadoras de Colonias/gramo (UFC/g) con ayuda de curvas de estandarización realizadas en un proyecto colateral a éste (Márquez, 2011) (gráficas 1 y 2). Una vez conocida la población se procedió a hacer diluciones decimales necesarias para cada microorganismo en tubos de 16x150 con SSI y tapón de rosca y se determinó el volumen a utilizar para inocular de 60 a 120 ufc/mL de las bacterias. Esto se aplicó a la dilución 10^{-1} de cada matriz y a cada una de las 30 pruebas realizadas a la misma.



Para estandarizar el cultivo de levadura, se cultivó en caldo Sabouraud por 48 h a 28°C y luego se midió la densidad óptica, de igual forma como se describió para las bacterias. El inóculo en las muestras se calculó para tener alrededor de 25 a 30 UFC /mL.

Gráfica 3. Curva de Estandarización para *S.cerevisiae*



Finalmente, para estandarizar el inóculo de *Penicillium* se cultivó en agar Sabouraud durante 7 días a 28°C, se cosecharon las esporas en SSI y se contaron por método microscópico directo, en 50 μ L de una dilución conocida; se contaron 10 campos y se aplicaron los cálculos pertinentes, conociendo el diámetro del campo y el volumen de muestra (anexo II). Los cálculos se hicieron para tener de 25 a 30 esporas /mL de muestra.

5.4 Determinación de mesófilos aerobios y coliformes totales

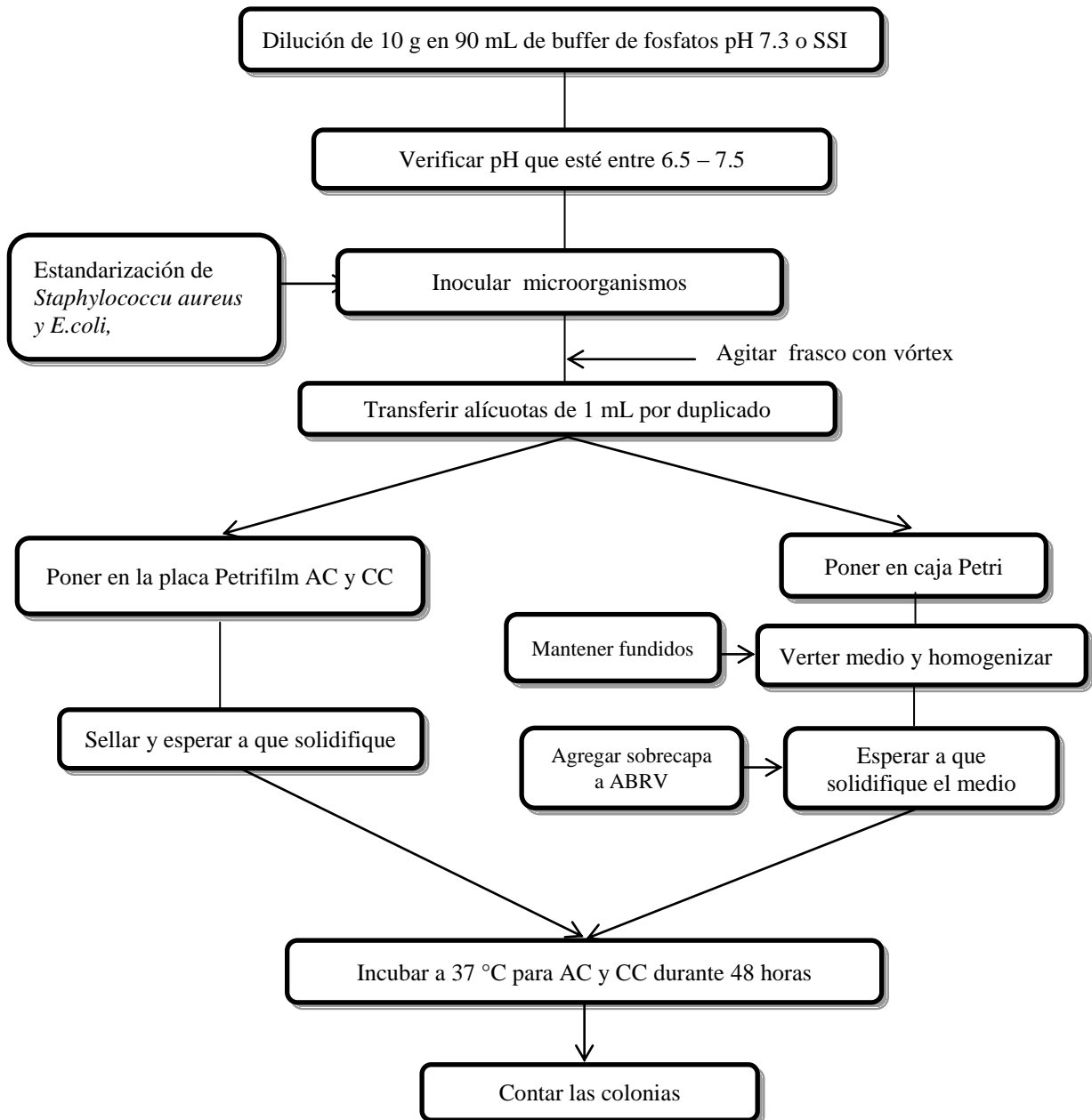
Las diluciones decimales se realizaron en buffer de fosfatos pH 7.3 para crema ácida, queso Oaxaca y queso panela; para el arroz con leche se utilizó SSI.

La dilución 10^{-1} se inoculó con *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 y *Escherichia coli* ATCC-1122 cultivadas por separado en caldo BHI durante 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ambas cepas proporcionadas por el cepario de la Facultad de Química, UNAM. Se calculó tener de 60 a 120 UFC/mL de dilución.

Para la prueba de mesófilos aerobios en el método tradicional se colocó 1 mL de alícuota en cajas Petri por duplicado, se agregó agar cuenta estándar fundido y mantenido a 45°C y se homogenizó. Para las placas Petrifilm™ AC también se agregaron alícuotas de 1 mL, por duplicado y se sellaron con los difusores.

Para la determinación de coliformes totales por el método tradicional se colocaron alícuotas de 1 mL en cajas Petri, se agregó agar bilis rojo violeta fundido y mantenido a 45°C , se homogenizó, se dejó solidificar y se agregó una sobrecapa. Para Petrifilm™ CC se usaron alícuotas de 1 mL de inóculo y se sellaron con el difusor. Todo fue realizado por duplicado. Las placas Petrifilm™ se guardaron en sobres conteniendo como máximo 20 placas; las cajas Petri se apilaron invertidas en pilas de 10. Todo se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 h.

Método para validación de Petrifilm™ AC y Petrifilm™ CC



5.5 Determinación de hongos y levaduras

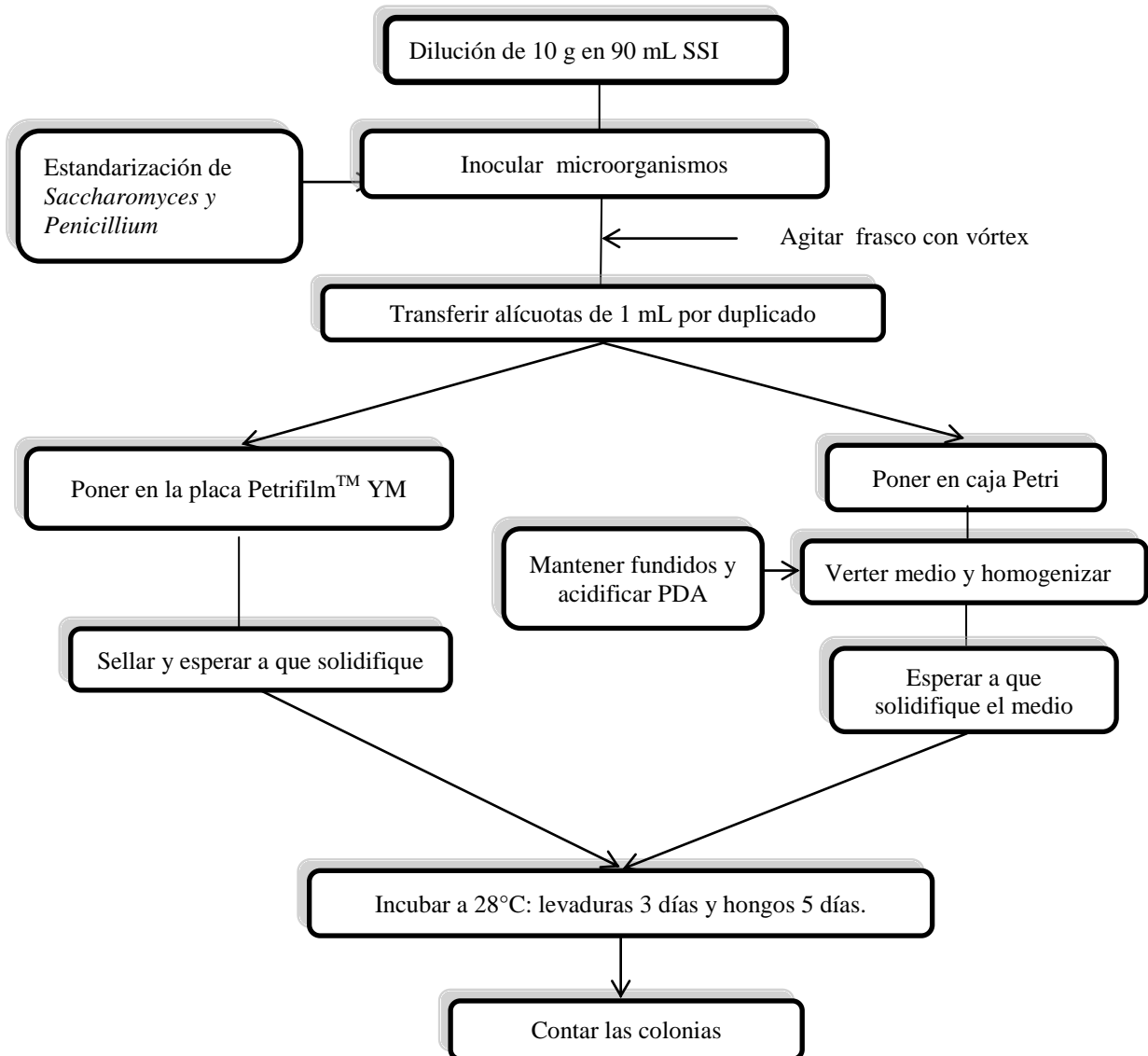
Las diluciones decimales se realizaron en buffer de fosfatos pH 7.3 estéril para crema ácida, queso Oaxaca y queso panela y en SSI estéril para el arroz con leche.

La dilución 10^{-1} se inoculó con *Saccharomyces cerevisiae* CFQ-L-25 y con *Penicillium* sp. CFQ-H-75, ambas cepas proporcionadas por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM. Se cultivaron por separado como se ha descrito en la estandarización del inóculo, y se calculó tener de 25 a 30 ufc/mL de dilución.

Para la prueba de hongos y levaduras en el método tradicional se colocó 1 mL de alícuota en cada caja Petri, por duplicado, agregando 20 mL de medio de cultivo agar papa dextrosa fundido, mantenido a 45 °C y acidificado con ácido tartárico al 10%; se homogenizan las placas y se dejan solidificar. En las placas Petrifilm™ YM también se inocularon alícuotas de 1 mL, por duplicado y se sellan con el difusor correspondiente.

Las placas Petrifilm™ se guardaron en sobres conteniendo como máximo 20 placas; en cuanto a las cajas Petri se colocaron invertidas en pilas de máximo 10 cajas. Todo se incubó a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; se observaron resultados a los 3 días para contar colonias de levaduras y durante otros dos días (5 en total) para contar hongos.

Método para validación de Petrifilm™ YM



6. Prueba de hipótesis estadística

Cuando se está validando un nuevo método contra un método tradicional ya existente, es fundamental determinar si hay diferencias significativas entre los métodos y –si las hay– cuál es el método más eficiente.

Una herramienta importante que se encarga de esto, es el diseño de experimentos, que permite obtener datos de manera planeada para probar algunas de las afirmaciones de interés mediante el planteamiento de una hipótesis estadística.

Una hipótesis estadística es una afirmación sobre los valores de los parámetros de una población o proceso, que es susceptible de probarse a partir de la información contenida en una muestra representativa obtenida de la población (Gutiérrez, 2004).

Un procedimiento que conduce a una decisión sobre una hipótesis en particular recibe el nombre de prueba de hipótesis, para ello existe la hipótesis nula (H_0) y la hipótesis alternativa (H_A). El nombre de hipótesis nula se deriva del hecho de que generalmente se plantea como una igualdad, lo cual facilita tener una distribución de probabilidad de referencia específica, suponiendo que H_0 es verdadera. La estrategia a seguir para probar una hipótesis, es suponer que la hipótesis nula es verdadera, que en caso de ser rechazada por la evidencia que aportan los datos, se estará aceptando la hipótesis alternativa. Así, en el caso de las proporciones, la afirmación que se desea probar se aceptará como cierta, sólo en caso de rechazar la hipótesis nula (Gutiérrez, 2004; Walpole, 1992).

Existen dos tipos de pruebas de hipótesis

- De dos colas o bilateral: El investigador desea comprobar la hipótesis de un cambio en el parámetro. El nivel de significancia se divide en dos y existen dos regiones de rechazo (Geociencias U.N.A.M., 2011).

H_0 : Parámetro = x

H_A : Parámetro $\neq x$

De una cola o unilateral.

- El investigador desea comprobar la hipótesis de que el parámetro sea mayor o menor que el de la hipótesis nula (Geociencias, UNAM, 2011).

$$\begin{array}{ll} H_0: \text{Parámetro} = x & \text{ó} & H_0: \text{Parámetro} = x \\ H_A: \text{Parámetro} < x & & H_A: \text{Parámetro} > x \end{array}$$

Para tales efectos de esta investigación y para poder plantear nuestra hipótesis utilizamos una hipótesis para dos medias ya que se hará la comparación de dos tratamientos: el método tradicional y el método Petrifilm™, usando muestras pareadas en donde se quiere probar si el método Petrifilm™ es igual de eficiente que el método tradicional. Es decir, la hipótesis a probar es:

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$$H_A: \mu \neq \mu_0$$

Bajo el supuesto de que H_0 es verdadera, el estadístico de prueba que se utiliza para poder tomar una decisión (si se acepta o se rechaza la hipótesis nula) es por medio de t de Student con $n - 1$ grados de libertad (n es el número de muestras). Se rechaza H_0 si el valor absoluto del estadístico de prueba ($|t\text{-exp}|$) es mayor que el valor crítico de la distribución (t-tablas) (Gutiérrez, 2004):

Se rechaza H_0 si $|t\text{-exp}| > t\text{-tablas}$.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS

7.1 Ajuste de pH en las muestras comerciales.

Es importante recordar que el control del pH de la muestra es fundamental para facilitar la interpretación de las placas; cuando el pH no es estable, vira todo el indicador y genera una coloración de fondo que hace difícil distinguir a las colonias por su color.

En las pruebas preliminares, se encontró que para los productos con pH entre 5 y 6, el ajuste con NaOH resultó difícil, por lo que se decidió diluir en buffer de fosfatos 0.1M pH 7.3 la crema ácida, el queso Panela y el queso Oaxaca. El arroz con leche tiene pH dentro del rango de 6.5 a 7.5 y es estable, por lo que se diluyó en SSI. En la tabla 1 se muestra el pH inicial de cada producto.

Tabla 1. pH inicial de cada producto				
Producto				
	Queso Panela	Queso Oaxaca	Crema Ácida	Arroz con leche
pH inicial	5	5	5.7	7.2
Diluyente para el análisis	Buffer de fosfatos pH 7.3	Buffer de fosfatos pH 7.3	Buffer de fosfatos pH 7.3	Solución salina isotónica estéril

7.2 Caracterización microbiológica de productos comerciales.

Se revisaron las NOM's que aplican a cada producto analizado: crema ácida, queso panela, queso Oaxaca y arroz con leche y se compararon los resultados obtenidos en la caracterización microbiológica, para determinar si los productos cumplen con las especificaciones establecidas, en cuanto a los indicadores estudiados en este trabajo. Tanto el queso panela como el Oaxaca corresponden a quesos frescos, según las definiciones de la NOM-121-SSA1-1994. Desde luego, todos los productos tienen otras especificaciones respecto a patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Salmonella*, que no fueron considerados en este trabajo.

Tabla 2. Normas aplicables para cada producto			
Producto	NOM aplicable	Indicador	Límite máximo permitido (UFC/mL o g)
Quesos frescos: Panela y Oaxaca	NOM-121-SSA1-1994 inciso 7.3	mesófilos aerobios	No se considera
		coliformes totales	No se considera
		Coliformes fecales	100 NMP/g
		hongos y levaduras	500
Lácteos ferment. y acidificados Crema ácida	NOM-185-SSA1-2002 inciso 7.2.2	mesófilos aerobios	No se considera
		coliformes totales	10
		hongos y levaduras	No se considera
Dulces a base de leche Arroz con leche	NOM-185-SSA1-2002 inciso 10.3.1	mesófilos aerobios	No se considera
		coliformes totales	10
		hongos y levaduras	No se considera

La tabla 3 muestra los resultados obtenidos en los análisis de los productos:

Tabla 3. Resultados caracterización de productos								
Producto	Indicador (UFC/g producto)							
	Mesófilos aerobios		Coliformes totales		Levaduras		Hongos	
	MT	PT	MT	PT	MT	PT	MT	PT
Queso panela	360	270	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e
Queso Oaxaca	510	460	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e
Crema ácida	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e
Arroz con leche	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e	<10 v.e

MT= Método tradicional

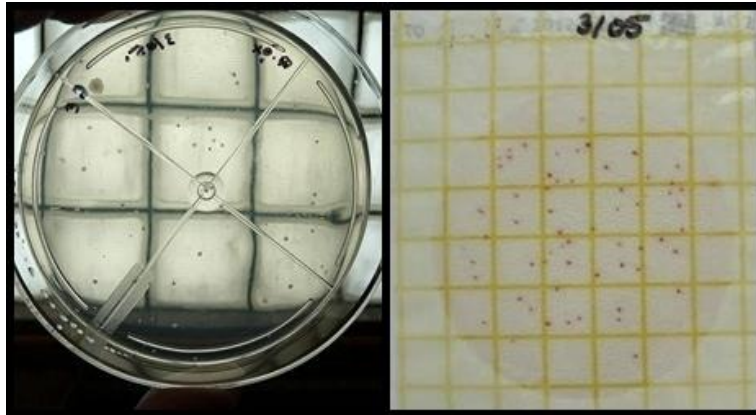
PT= Método Petrifilm™

v.e.= valor estimado

Se observa la presencia de mesófilos aerobios en ambos quesos, debido a que en su proceso de elaboración se utiliza leche pasteurizada y en este tratamiento no hay una eliminación total de los microorganismos, por lo que se debe tener un control estricto de las condiciones de almacenamiento para evitar que estos microorganismos crezcan y haya deterioro temprano del producto; además se utilizan bacterias ácido lácticas en la elaboración del queso Oaxaca, para lograr una acidez que permita modelar las hebras. Esto explica también la cantidad de mesófilos aerobios en el queso Oaxaca. En coliformes totales no se obtuvo crecimiento, por lo que puede establecerse que ambos quesos cumplen con la

especificación sobre coliformes fecales. Lo mismo sucede con hongos y levaduras, ya que los resultados están muy por debajo del límite establecido en la NOM. Puede decirse que ambos quesos cumplen con la normatividad.

Determinación mesófilos aerobios en Queso Oaxaca

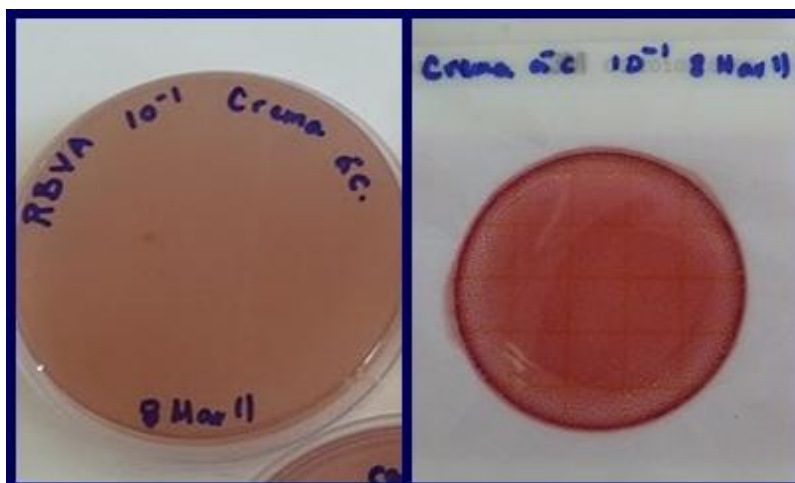


Método tradicional

Petrifilm™AC

Para crema ácida y arroz con leche no hay especificación de mesófilos ni de hongos y levaduras. Ambos productos cumplen con la especificación de coliformes totales y, en general, los recuentos tan bajos en todos los grupos, indican una calidad microbiológica aceptable.

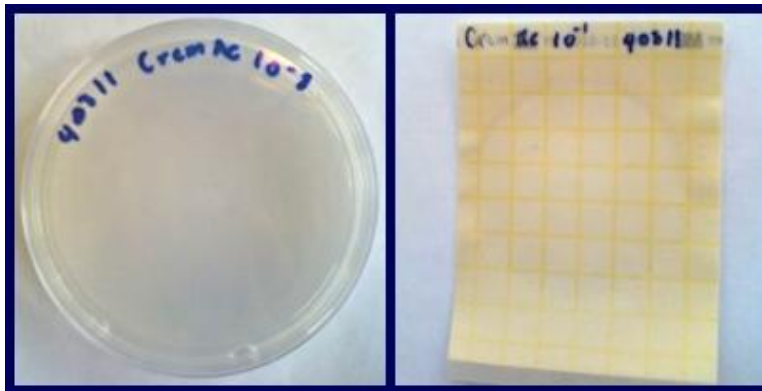
Determinación de coliformes totales crema ácida.



Método tradicional

Petrifilm™CC

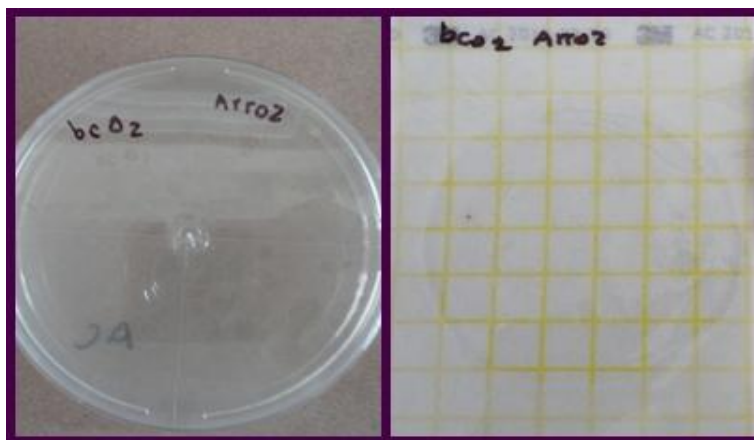
Determinación de hongos y levaduras crema ácida.



Método tradicional

Petrifilm™ YM

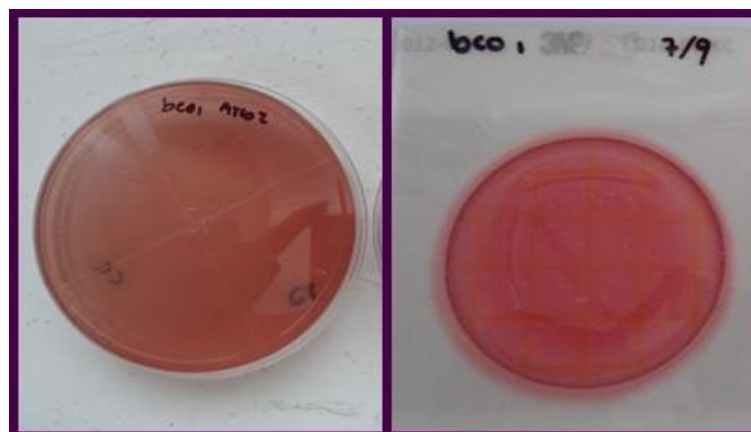
Determinación de mesófilos aerobios arroz con leche



Método tradicional

Petrifilm™ AC

Determinación de coliformes totales en arroz con leche



Método tradicional

Petrifilm™ CC

Realizar este análisis también fue importante para tomar en cuenta el número de microorganismos con los que cuenta el producto naturalmente al verificar la cantidad de UFC recuperadas en el producto cuando se inocula con poblaciones conocidas, para llevar a cabo la validación del método.

Desde luego, en todos estos análisis se corrieron controles positivos con cepas proporcionadas por el Cepario de la Facultad de Química, y blancos para prueba de esterilidad. Todos dieron los resultados esperados.

Cabe señalar que aunque se trabajó con los tres indicadores más importantes: mesófilos aerobios, coliformes totales y mohos y levaduras, los resultados de coliformes totales no fueron consistentes para ninguno de los métodos, en ninguna de las etapas de validación. No fue posible estandarizar la recuperación del inóculo conocido, lo cual puede tener otras fuentes de error, en los diluyentes, medios y/o placas, aparte del efecto de las matrices. Se decidió no reportar los resultados de coliformes totales porque no es posible concluir en ningún sentido.

7.3 Validación de placas Petrifilm™

A continuación, para cada producto, se hablará brevemente de la influencia de la matriz en la recuperación de células para cada método y se explicará si hubo diferencia significativa entre ambos métodos, determinada por la prueba estadística t-Student. Antes de aplicar la prueba se promediaron los duplicados de cada muestra, se aplicó el factor de dilución y se transformaron los datos a logaritmos. Se aplicó la prueba t-Student de dos colas y pareada con un nivel de significancia de 5% con 29 grados de libertad, para determinar si hay diferencia significativa entre Petrifilm AC y YM y los métodos tradicionales respectivos, descritos en las Normas Oficiales Mexicanas: NOM-092-SSA1-1994 para mesófilos aerobios y la NOM-111-SSA1-1994 para hongos y levaduras.

También se examinó la repetibilidad de cada método mediante diagramas de caja que dan cuenta de la dispersión de los datos en cada método. Así entre más larga la caja, más alejados los datos, más dispersa es la distribución de éstos. También se muestra qué tan alejadas se encuentran las medias de ambos métodos (representadas por cuadros dentro de las diagramas).

Al calcular la t-Student se determina si se acepta la hipótesis nula; cuando la t experimental en valor absoluto sea menor a la t-tablas, significa que no hay diferencia significativa entre ambos métodos y por lo tanto se pueden usar ambos con iguales resultados. Pero si ocurre lo contrario, que se rechace la hipótesis nula, entonces se dice que si hay diferencia significativa y se procede a determinar cuál de los dos métodos es más eficiente, en función del porcentaje de recuperación de los microorganismos inoculados.

7.3.1 Queso Panela

La tabla 4 muestra los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico.

Tabla 4. Prueba estadística t-Student para Queso panela			
Indicador	t-tablas	t-experimental	Resultado
Mesófilos aerobios	2.045	2.3962	Si hay diferencia significativa entre ambos métodos
Levaduras		11.9177	Si hay diferencia significativa entre ambos métodos
Hongos		3.6156	Si hay diferencia significativa entre ambos métodos

El análisis estadístico de la tabla 4 muestra que la t-tablas es menor que la t-experimental para todos los indicadores microbiológicos usados en este proyecto por lo que existe diferencia significativa entre ambos métodos, a continuación se discutirá con que método se obtuvo mayor recuperación de colonias y en qué porcentaje.

La tabla 5 muestra los resultados obtenidos en las 30 muestras analizadas.

Tabla 5. Resultados experimentales obtenidos para el Queso Panela			
indicador		Método tradicional (UFC/g)	Petrifilm™ (UFC/g)
mesófilos aerobios	promedio	950	730
	control	1130	1050
	blanco	480	320
	inóculo teórico	1000-1200	
levaduras	promedio	9	30
	control	0	40
	blanco	<10 v.e	
	inóculo teórico	40-50	
hongos	promedio	220	280
	control	290	270
	blanco	<10 v.e	
	inóculo teórico	200-300	

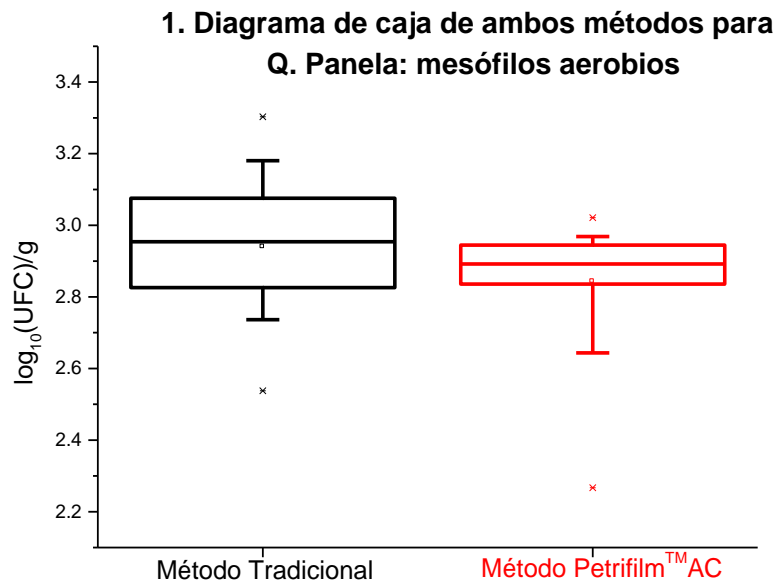
v.e= valor estimado

Para mesófilos aerobios, en los controles de ambos métodos se recuperó la cantidad esperada teóricamente, es decir la cantidad inoculada; sin embargo la recuperación en las treinta muestras contaminadas intencionalmente se encuentra por debajo de lo que los controles muestran, tanto en el método tradicional como en Petrifilm™ AC. La causa de esta diferencia puede radicar en que *Staphylococcus aureus*, bacteria que utilizamos para inocular las muestras, es poco competitiva y como el queso panela presenta microbiota nativa entonces le dificulta el desarrollo a esta bacteria. También puede ser que los microorganismos originarios del queso produzcan sustancias, como bacteriocinas, que impida el desarrollo de otros microorganismos, como los marcadores utilizados para este análisis (*E. coli* y *Staphylococcus*).

Es importante recalcar que el conteo de colonias se facilita mucho por medio de Petrifilm™ AC, ya que por el método tradicional las partículas del queso pueden ser confundidas con las colonias, en tanto que el color desarrollado debido al indicador TTC evita esta dificultad en Petrifilm™.

Con respecto a la recuperación de colonias, teóricamente debía ser la suma entre la cantidad inoculada más lo obtenido en los blancos (la microbiota nativa); es decir, alrededor de 1400 a 1600 UFC/g, sin embargo los resultados por los dos métodos están por debajo de lo esperado.

La recuperación es mejor por el método tradicional (23.16%) como lo muestra el diagrama 1 en donde se aprecia que el promedio en MT está por encima del promedio en método Petrifilm™ AC. Este resultado parece muy lógico si se piensa que hay bacteriocinas (u otros productos de la microbiota nativa con efecto inhibidor) puesto que dichos inhibidores se diluyen un poco en los 18-20 mL de medio del MT y no así en Petrifilm™.

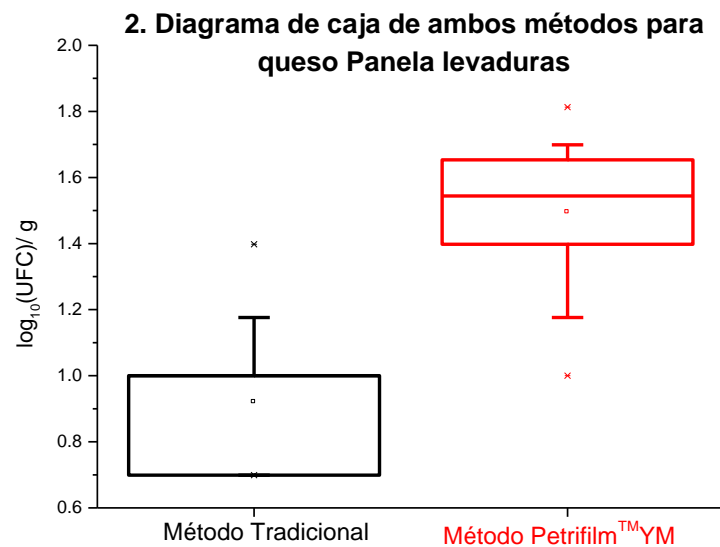


En la determinación de levaduras se aprecia que si hay diferencia significativa entre los métodos y Petrifilm™ tiene una mejor recuperación. De hecho, en el método tradicional no se logra recuperar ni siquiera el inóculo teórico, lo que si sucede en el control para Petrifilm™.

Esta prueba se repitió porque en la primera corrida falló el control de temperatura (estuvo en 34°C) pero al repetir, con la temperatura bien controlada, la recuperación en Método tradicional sigue siendo escasa. Esto hace pensar que

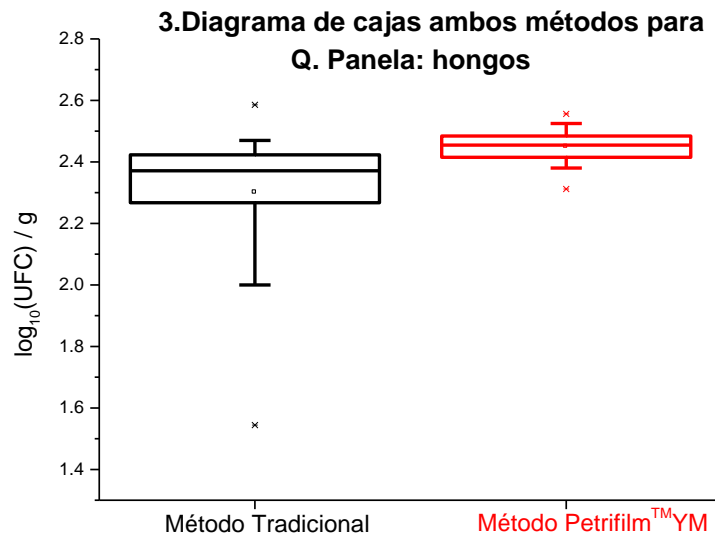
Petrifilm™ es menos sensible a variaciones de temperatura. Otras diferencias importantes son: la facilidad para contar las colonias en Petrifilm™ YM, ya que en Método tradicional se confunden con las partículas de alimento; y la velocidad de crecimiento: en Petrifilm™ YM se obtuvieron resultados a los 3 días (como siempre se hace) mientras que en el Método tradicional se observó crecimiento hasta el 4° día de incubación.

Con respecto a hongos, si hay diferencia significativa entre ambos métodos y se aprecia que la recuperación es mejor en Petrifilm™ (23 % mayor), lo que aunado a la facilidad para diferenciar a las colonias de restos del alimento, lo hacen realmente un excelente método para esta determinación. En esta determinación sucedió lo mismo que en la de levaduras cuanto tuvimos un problema de control de temperatura, y los resultados son semejantes: Petrifilm™ no se vió tan afectado por la variación en la temperatura.



Al observar los diagramas 2 y 3 se puede apreciar que la media del método Petrifilm™ YM se encuentra por encima del método tradicional recuperando en levaduras 70.0% más a pesar de que la dispersión de los datos es mayor. En

hongos la recuperación es de 23% más que el método tradicional con muy poca dispersión de datos; en ambos casos Petrifilm™ tuvo mejor recuperación (datos no mostrados) cuando la temperatura de incubación estuvo accidentalmente por arriba de la óptima para esta prueba.



7.3.2 Queso Oaxaca

Indicador	t-tablas	t-experimental	Resultado
mesófilos aerobios	2.045	7.7611	Si hay diferencia significativa entre ambos métodos
Levaduras		12.1485	Si hay diferencia significativa entre ambos métodos
Hongos		7.0523	Si hay diferencia significativa entre ambos métodos

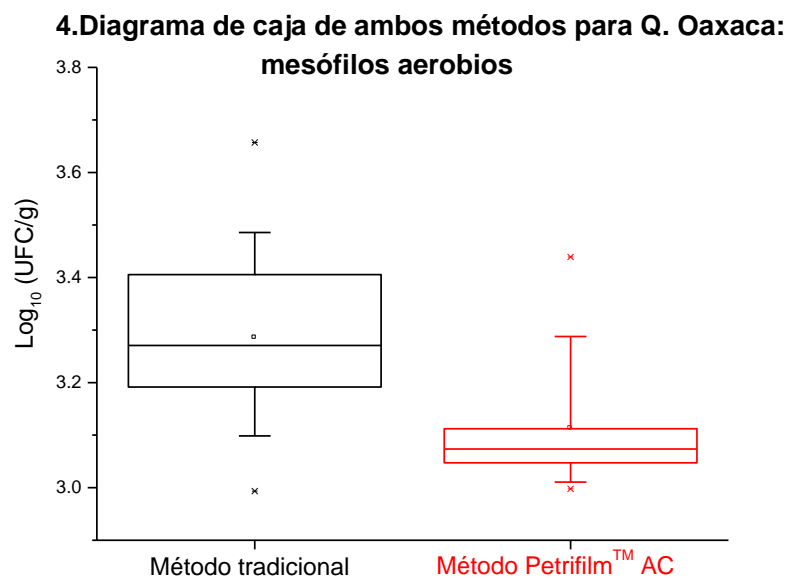
Los resultados mostrados en la tabla 6 indican que si existe diferencia significativa entre ambos métodos para todos los indicadores; a continuación se irá detallando brevemente el método en donde hubo mejor recuperación y en qué porcentaje.

indicador		Método tradicional (UFC/g)	Petrifilm™ (UFC/g)
mesófilos aerobios	promedio	2060	1360
	control	1290	1190
	blanco	590	550
	inóculo teórico	1000-1200	
levaduras	promedio	40	100
	control	10	80
	blanco	<10 v.e	
	inóculo teórico	70-80	
hongos	promedio	130	310
	control	190	290
	blanco	<10 v.e	
	inóculo teórico	200-300	

v.e= valor estimado

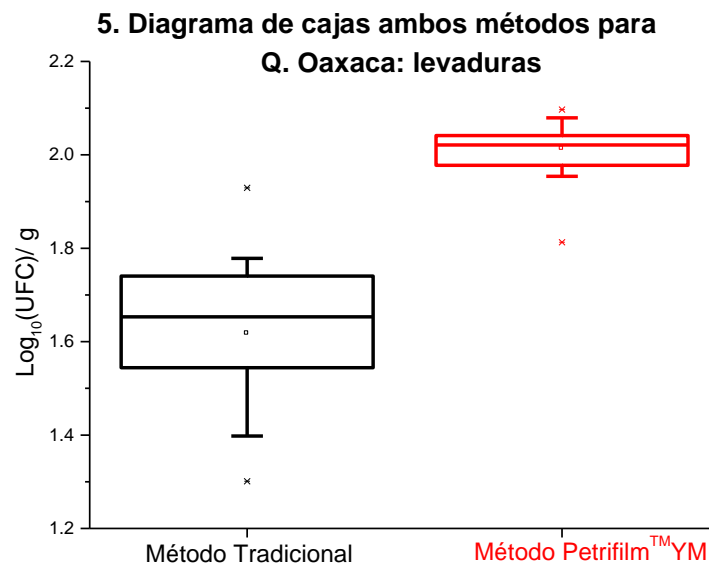
En el caso de mesófilos aerobios, se observa en la tabla 7 que en los controles se obtienen los resultados esperados en función del inóculo teórico. Sin embargo hay que considerar que las muestras tienen cierta microbiota, que ya se había encontrado en el análisis de muestras comerciales y que también se detectó en los blancos (muestras sin inocular). El total de colonias recuperadas debería

esperarse que fuese la suma del blanco más el control, es decir alrededor de 1900 UFC/g; esto se cumple en el método tradicional pero no en Petrifilm™AC, donde la recuperación se encuentra por debajo de lo esperado. Este resultado indica que la recuperación es mayor en MT y también refuerza la suposición anterior, de que puede haber bacteriocinas y/o competencia de la microbiota nativa, que se puede “diluir” en los 18 ó 20 mL de agar del MT mientras que en Petrifilm™ al quedar todo el inóculo y muestra en sólo 1mL, no se tiene este efecto.



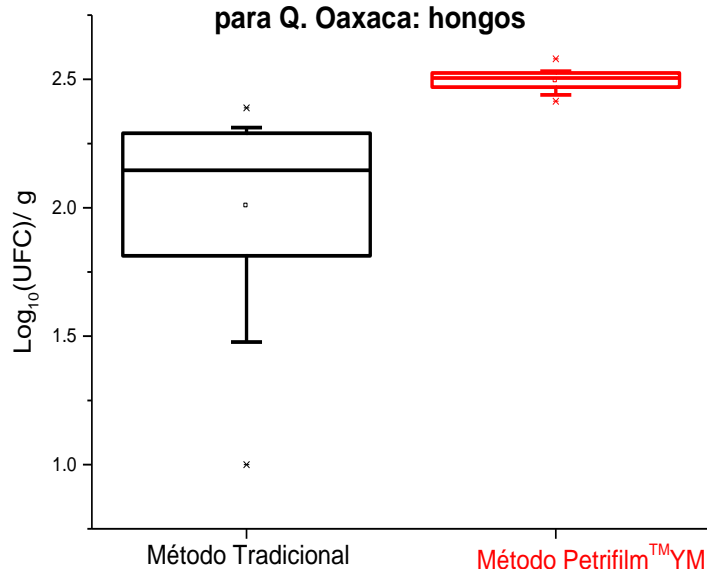
En el diagrama de cajas 4 se puede observar que existe una mayor dispersión en los datos del método tradicional, sin embargo hay un 34% más de recuperación en este método que por medio de Petrifilm™AC.

Para los resultados que se obtuvieron con levaduras, observamos que el producto no interfiere en el análisis pues en ambos casos los resultados en las muestras inoculadas son cercanos a sus controles; sucediendo lo mismo para la determinación de hongos.



Debido a que existe diferencia significativa en ambos métodos para el análisis de levaduras podemos observar en el diagrama 5 que la media de Petrifilm™ YM se encuentra por encima de la media del método tradicional, lo que indica que hay mayor recuperación en este método; de hecho se obtienen recuperaciones hasta de 60% más respecto al método tradicional. Respecto a hongos sucede lo mismo, la media de Petrifilm™ YM que muestra el diagrama 6, es superior a la media del método tradicional recuperando 58.06% más. Además, presenta muy poca dispersión en los datos. Lo anterior nos indica que el uso de placas Petrifilm™ YM es un método confiable para llevar a cabo el análisis microbiológico de hongos y levaduras en este tipo de quesos. Y sigue siendo mucho más fácil contar en Petrifilm™ que en método tradicional, por el aspecto de las colonias, que no se confunden con partículas del queso.

6. Diagrama de caja ambos métodos para Q. Oaxaca: hongos



7.3.3 Crema ácida

Tabla 8 Prueba estadística t-Student para Crema Ácida			
Indicador	t-tablas	t-experimental	Resultado
Mesófilos aerobios	2.045	0.821	No hay diferencia significativa entre ambos métodos
Levaduras		0.480	No hay diferencia significativa entre ambos métodos
Hongos		9.256	Si hay diferencia significativa entre ambos métodos

La tabla 8 indica que no existe diferencia significativa para la determinación de mesófilos aerobios, entre el método tradicional y Petrifilm™ AC, por lo tanto ambos pueden utilizarse con resultados semejantes.

Al observar los resultados de mesófilos aerobios en la tabla 9, vemos que para el control en ambos métodos, el número de UFC/ g es muy similar a lo esperado en función del inóculo teórico (1000 a 1200 UFC/ mL). Los promedios de las 30 muestras son ligeramente superiores; dado que la microbiota nativa del producto no parece ser la causa, según los resultados del blanco, se atribuye a la matriz,

pero el efecto es tan parecido en ambos métodos que la prueba estadística no detecta diferencia significativa.

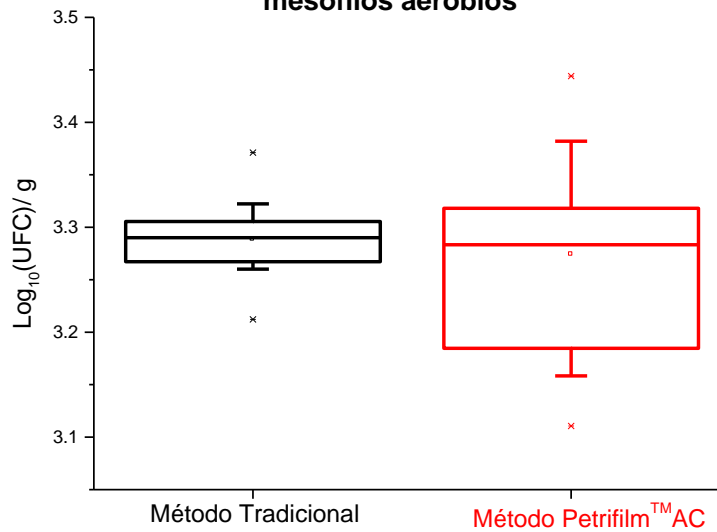
Tabla 9 Resultados experimentales obtenidos para crema ácida			
indicador		Método tradicional (UFC/g)	Petrifilm™ (UFC/g)
mesófilos aerobios	promedio	1350	1220
	control	1260	1170
	blanco	<10 v.e	
	inóculo teórico	1000-1200	
levaduras	promedio	60	60
	control	120	240
	blanco	<10 v.e	
	inóculo teórico	100-200	
hongos	promedio	240	330
	control	240	300
	blanco	<10 v.e	
	inóculo teórico	200-300	

v.e= valor estimado

Para el caso de levaduras, la tabla 8 muestra que no hay diferencias significativas entre los dos métodos por lo tanto es indistinto su uso. Sin embargo la tabla 9 indica que hay una deficiente recuperación con respecto a lo que los controles indican por lo que la matriz puede estar interfiriendo en el método de análisis de este grupo.

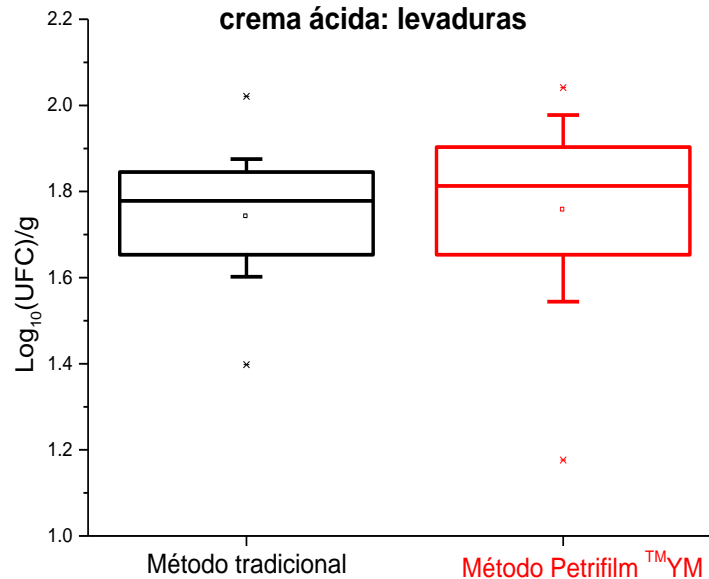
Con respecto a hongos sí existe diferencia significativa entre los dos métodos. Como muestra la tabla 9, la recuperación en con Petrifilm™ YM es 27.3 % mayor que en el método tradicional.

7. Diagrama de caja ambos métodos para crema ácida: mesófilos aerobios

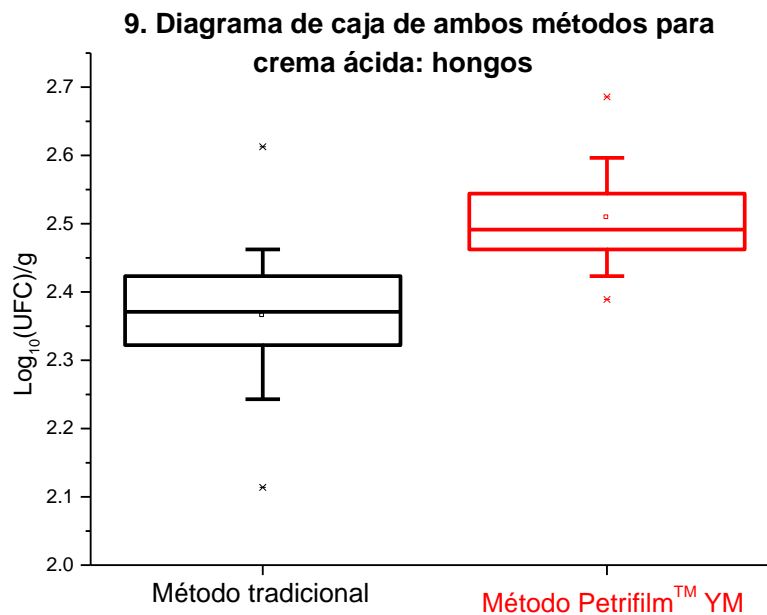


En el diagrama 7 se aprecia que mesófilos aerobios, ambos métodos presentan una media similar, sin embargo el método Petrifilm™ presenta mayor dispersión que el método tradicional.

8. Diagramas de caja de ambos métodos para crema ácida: levaduras



El diagrama de caja número 8 para levaduras nos muestra que hay mayor dispersión en el método Petrifilm™ YM pero que las medias de los dos métodos son muy cercanas; no habiendo diferencias significativas, determinadas estadísticamente, ambos métodos son confiables para su uso en el análisis de levaduras para este producto.



En el diagrama de cajas número 9 están representados los resultados obtenidos para hongos. Se observa que hay menor dispersión en el método Petrifilm™ YM, y que además tiene una mejor recuperación en el recuento microbiano, lo que permite obtener resultados más seguros que por el método tradicional.

7.3. 4 Arroz con leche

Tabla 10 Tratamiento estadístico para arroz con leche			
Indicador	t-tablas	t-experimental	Resultado
Mesófilos aerobios	2.045	11.2605	Si hay diferencia significativa entre ambos métodos
Levaduras		11.9602	Si hay diferencia significativa entre ambos métodos
Hongos		9.8832	Si hay diferencia significativa entre ambos métodos

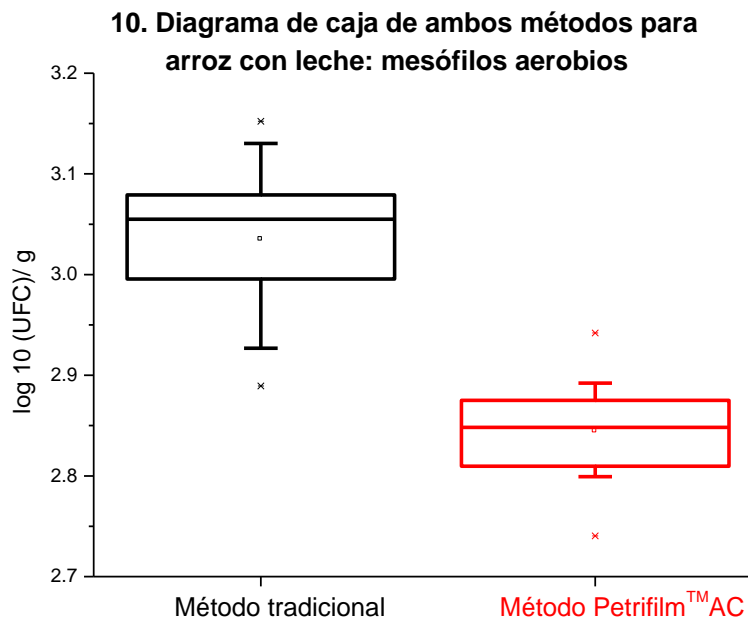
Para este producto la tabla 10 muestra que sí existe diferencia significativa en los dos métodos de análisis, para todos los indicadores microbiológicos, ya que la t experimental es mayor que la t de tablas. A continuación se discutirá qué método resulta tener mejor recuperación y en qué porcentaje.

Para el caso de mesófilos aerobios la tabla 11 indica que los controles para ambos métodos se encuentran dentro del rango esperado; sin embargo, aunque la recuperación de Petrifilm™ en el control fue un poco mayor que en el MT, sucede lo contrario en los promedios de las muestras inoculadas, sugiriendo un efecto de la matriz y una mejor recuperación en método tradicional.

Tabla 11 Resultados experimentales obtenidos para arroz con leche			
indicador		Método tradicional (UFC/g)	Petrifilm™ (UFC/g)
mesófilos aerobios	promedio	1080	700
	control	810	970
	blanco	<10 v.e	
	inóculo teórico	800-1000	
levaduras	promedio	40	290
	control	20	460
	blanco	<10 v.e	
	inóculo teórico	400-500	
hongos	promedio	120	330
	control	80	270
	blanco	<10 v.e	
	inóculo teórico	200-300	

v.e. = valor estimado

Respecto a la dispersión de los datos obtenidos, el diagrama 13 muestra que hay una dispersión similar para los dos métodos pero el promedio del método tradicional se encuentra por encima del método Petrifilm™ AC, lo que indica que hay mejor recuperación para este método, del orden de 35.2% más con respecto Petrifilm™ AC, por lo que conviene más el uso del método tradicional.

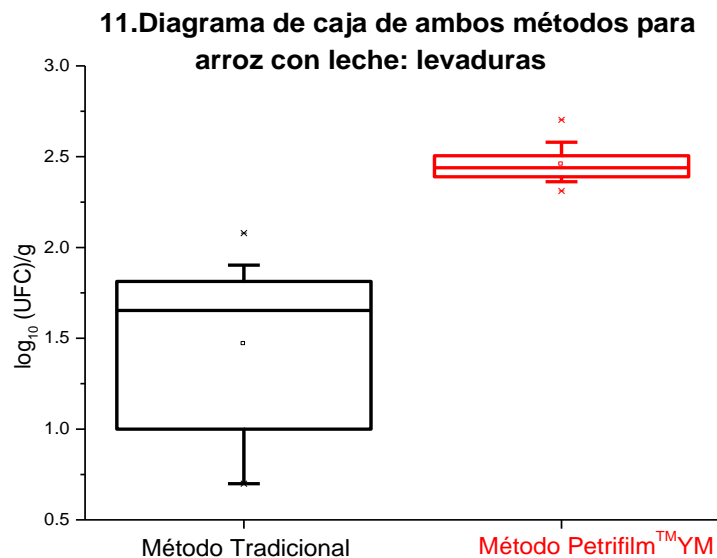


Para los resultados de levaduras se observa que el control obtenido en Petrifilm™ YM (460 UFC/g producto) está dentro del rango esperado (400-500 UFC/g) sin embargo en el producto inoculado aunque la recuperación es menor, puede decirse que se mantiene en el orden de magnitud. En cuanto al método tradicional podemos ver que tanto en el control como en el producto inoculado la recuperación es muy escasa, de hecho se encuentra muy por debajo del inóculo teórico, cabe destacar que además el crecimiento fue muy lento; no se detectaba casi a las 72 h (como siempre se hace) y sólo pudieron contarse a los 5 días. Esto también constituye una diferencia considerable en el desempeño de ambos métodos.

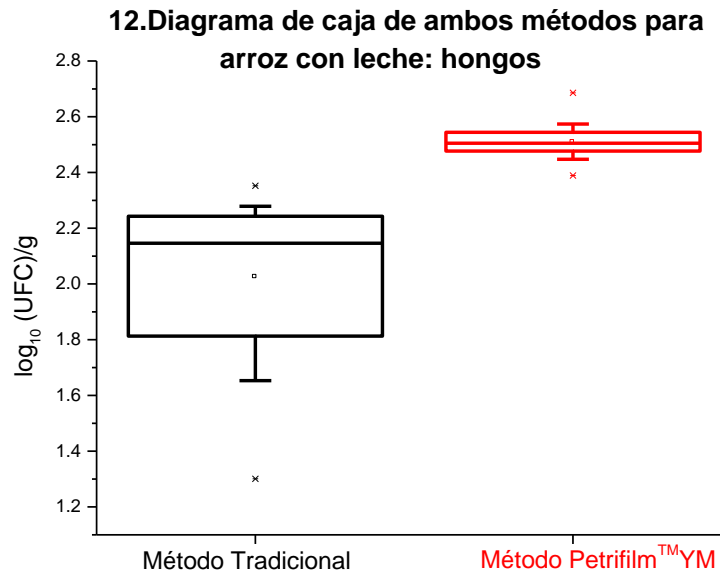
En hongos sucede lo mismo: en el método tradicional, tanto en el control como en la matriz inoculada el número de UFC/g recuperadas se encuentra muy por debajo de lo esperado; además de que el crecimiento en las colonias fue muy lento, apenas empezaban a notarse al final del periodo de incubación. Para Petrifilm™YM, el control obtiene el número de UFC/g esperado, para la matriz inoculada la recuperación que se obtiene es muy buena, ya que los resultados son ligeramente superiores a los que el control presenta.

Cabe destacar que en la determinación de hongos y levaduras, Petrifilm™ YM facilita mucho la identificación de colonias, en comparación con el método tradicional.

En el diagrama 11 podemos observar que en la detección de levaduras, existe poca dispersión en Petrifilm™ YM además de que el promedio de las muestras es mayor que el del método tradicional; se tiene 86.21% más de recuperación con Petrifilm™ YM en comparación con método tradicional, lo cual aunado a la facilidad de identificación de colonias en el recuento, realmente da una ventaja importante a Petrifilm para el análisis microbiológico en este tipo de productos.



En cuanto a hongos, igualmente la mejor recuperación se obtiene en Petrifilm™YM con 63.6% más que en el método tradicional y con muy poca dispersión en datos obtenidos por las 30 muestras inoculadas (Diagrama 12).



7.4 Resumen del análisis estadístico

La tabla 12 muestra todos los resultados obtenidos para cada indicador con cada uno de los productos analizados; también indica con cuál método hubo mejor desempeño en cuanto a la recuperación de células inoculadas en las unidades de prueba analizadas.

Tabla 12. Resultados para cada indicador con cada producto				
Producto	Indicador	t-tablas	t-experimental	Mejor desempeño
Queso Panela	mesófilos aerobios	2.045	2.3962	MT
	levaduras		11.918	MP
	hongos		3.616	MP
Queso Oaxaca	mesófilos aerobios	2.045	7.761	MT
	levaduras		12.149	MP
	hongos		7.052	MP
Crema ácida	mesófilos aerobios	2.045	0.821	No hay diferencia significativa
	levaduras		0.48	No hay diferencia significativa
	hongos		9.256	MP
Arroz con leche	mesófilos aerobios	2.045	11.261	MT
	levaduras		11.960	MP
	hongos		9.883	MP

El estudio demuestra que no hay diferencias significativas entre ambos métodos, para la determinación de mesófilos aerobios ni para la determinación de levaduras en crema ácida.

En cuanto a ambos quesos y el arroz con leche sí hay diferencias significativas y el Método tradicional tiene mejor desempeño para la determinación de mesófilos aerobios.

Para la determinación de hongos sí hay diferencias significativas entre ambos métodos; Petrifilm™ tiene mejor desempeño en las cuatro matrices estudiadas en tanto que para levaduras resulta tener mejor desempeño Petrifilm™ en queso panela, queso Oaxaca y arroz con leche.

Para las placas Petrifilm™CC y método tradicional para coliformes totales no fue posible hacer un análisis debido a que no hubo resultados consistentes a lo largo del estudio.

8. Conclusiones

Las placas Petrifilm™ constituyen un método alternativo para la detección de indicadores microbiológicos, específicamente de hongos y levaduras, en las matrices estudiadas. Tienen mejor desempeño en la recuperación de células (eficiencia) y se reduce considerablemente la carga de trabajo en actividades de preparación de medios de cultivo.

Además de la diferencia estadística, el uso de placas Petrifilm™ facilita el recuento de colonias y permite distinguir muy bien entre éstas y las partículas de alimento, lo que es una gran ventaja en estas matrices.

En algunos casos se requieren ajustes muy sencillos para el uso de placas Petrifilm™, por ejemplo utilizar buffer de fosfatos como diluyente, para facilitar el ajuste de pH que es muy importante para este método, específicamente para mesófilos aerobios.

Respecto a determinación de mesófilos aerobios, se recomienda hacer más estudios para determinar si la presencia de bacteriocinas o de productos metabólicos microbianos como ácido láctico, es la razón por la cual Petrifilm™ es menos eficiente en la recuperación de microorganismos; esta posibilidad ha sido sugerida antes y siempre debe ser considerada en matrices que tienen procesos fermentativos.

Los resultados obtenidos a lo largo del proyecto muestran que, efectivamente, la matriz tiene una enorme influencia en el desempeño del método, por lo que es importante hacer las validaciones para cada sistema o matriz alimentaria.

Bibliografía

- Alonso Nore, L.X. y J.A. Poveda. 2008. Estudio Comparativo en Técnicas de Recuento Rápido en el Mercado y Placas Petrifilm 3M para el Análisis de Alimentos. Tesis para la obtención del grado como Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- Álvarez, P. 2009. Requerimientos sobre Validación de Métodos en el marco de la Acreditación de Laboratorios según la norma ISO 17025. Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Argentina. Disponible a través de Internet en: <http://www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/seminario/apuntes.pdf>
- Barembuem C. 2003. Guía para Validación de Métodos de Ensayo, Organismo Argentino de Acreditación (Código DC-LE-05), Argentina, 26/09/2003. Disponible a través de: <http://www.docstoc.com/docs/50924573/GUIA-PARA-VALIDACION-DE-METODOS-DE-ENSAYO>
- Caballero, A. 2008. Control microbiológico de los alimentos. En V. Leyva, T. Martino y Y. Puig eds. *Temas de higiene de los alimentos. La Habana: Ciencias Médicas*, capítulo 2.
- Camacho, A., M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
- *Codex Alimentarius*, 1996. Informe de la segunda reunión del Comité del *Codex* sobre la leche y los productos lácteos. Apéndice X del Código de Principios referentes a la leche y los productos lácteos. Portal de la FAO, Departamento de Agricultura. Italia. Disponible a través de internet en: <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/w2198s/W2198S11.htm> [Último acceso el 23 noviembre de 2011].
- *Codex Alimentarius*, 1998. Informe de la Tercera Reunión del Comité del *Codex* sobre la Leche y los Productos Lácteos. Apéndice II: Proyecto de Norma General para el Uso de Términos Lecheros. Portal de la FAO, Departamento de Agricultura. Uruguay. Disponible a través de internet en: <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/w9503s/w9503s0g.htm> [Último acceso el 23 noviembre de 2011].
- Cuesta A. 2010. Validación de los métodos microbiológicos. Herramientas estadísticas. Control Metrológico, Colombia. Disponible a través de internet en: <http://www.controlmetrologico.com/docs/estadisticaenmicrobiologia.pdf>.

- Coordinación General de Ganadería, SAGARPA. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2010. Claridades agropecuarias. No 207.
- De los Reyes G. Cu, G.; Molina S. B y Coca V. R. Calidad de la leche cruda. *Primer Foro sobre Ganadería Lechera de la Zona Alta de Veracruz*. México 2010.
- Frazier, W; Westhoff D. Principios generales de la conservación de alimentos: asepsia, eliminación de microorganismos y anaerobiosis. En Frazier, W; Westhoff D. (editors). *Microbiología de los alimentos*. New York. Acribia. Capítulo 2.
- Geociencias, UNAM. 2011. Pruebas de hipótesis. Disponible a través de internet en: <http://www.geociencias.unam.mx/~ramon/Estadistica/Clase5b.pdf> [Último acceso el 9 enero 2012].
- Goff, D., 2002. Pasteurization. *Dairy Science & Technology, Educational Series*. University of Guelph, Canada. Disponible a través de Internet en: <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/>
- Goff, H., Griffiths, M., 2006. Major Advances in Fresh Milk and Milk Products: Fluid Milk Products and Frozen Desserts. *American Dairy Science Association*. 89:1163–1173
- Granados, R.; Villaverde Ma. 2003. Enterobacterias y Vibrios. *Microbiología Tomo I*. España. Editorial Paraninfo. Pp 103.
- Gutiérrez Pulido, H y de la Vara Salazar, R. Análisis y diseño de experimentos. México. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Pp 24-62.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M., 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food microbiology*, 27. pp 710-730
- Jay, J. 1992. Incidencia y tipos de microorganismos presentes en los alimentos. En: J. Jay ed. *Microbiología moderna de los alimentos*. New York. Acribia. pp 75-111.
- Jay, J.M. 2000. *Modern Food Microbiology*. 6th edition. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, EUA.

- Jordano R.; Medina L. 1999. Petrifilm –An enhanced cultural technique–. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Universidad de Córdoba, España. Pp 1662-1671.
- Kellner R., Mermet, J., Otto, M., Widner, H. 1998. *Analytical Chemistry*, Wiley-VCH. Alemania.
- Márquez Huerta I.L. Comparación de método Petrifilm™ con método tradicional para determinación de indicadores microbiológicos en alimentos de pH bajo. Tesis para la obtención del grado como Química de alimentos. UNAM. Facultad de Química. México.
- Micronoticias. 3M microbiología, 2006. Placas Petrifilm para el recuento de aerobios totales (AC). Portal de 3M de México. Disponible a través de internet en: http://solutions.3m.com.mx/wps/portal/3M/es_MX/Microbiologia/Home/Micro/MicronoticiasHistorial/
- Micronoticias. 3M microbiología, 2005. Placas Petrifilm para el recuento de coliformes (CC). Portal de 3M de México. Disponible a través de internet en: http://solutions.3m.com.mx/wps/portal/3M/es_MX/Microbiologia/Home/Micro/MicronoticiasHistorial/
- NordVal, NMKL. Protocol for the validation of alternative microbiological methods. 2009. National Veterinary Institute. Norway. Disponible a través de Internet en: <http://www.nmkl.org/NordVal/NordValprotocolmarch2009.pdf>
- Ortega, M., Rodríguez, C., Zhurbenko, R. 2010. Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. Métodos cualitativos. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, **48** (2). pp 162-176.
- Pérez Bonastre, A., 2008. Validación de métodos microbiológicos rápidos para la detección de patógenos en la industria de las botanas. Tesis para obtención del grado de Químico de alimentos. UNAM. Facultad de Química. México.
- Piñeiro y Díaz, 2004. Mejoramiento de la Calidad e Inocuidad de las Frutas y Hortalizas Frescas: Un Enfoque Práctico. Manual para Multiplicadores. Portal de la FAO, Departamento de Agricultura. Roma. Disponible a través de internet en: <http://www.fao.org/docrep/007/y5488s/y5488s08.htm> [Último acceso el 12 de octubre de 2011].

- Profeco. 2011. Normas Oficiales Mexicanas. Marco Normativo. Portal de la Procuraduría Federal del Consumidor. México. Disponible a través de Internet en: <http://www.profeco.gob.mx/juridico/noms.asp>. [Último acceso el 11 de octubre de 2011].
- Ruegg, P. 2003. Practical Food Safety Interventions for Dairy Production. *American Dairy Science Association*. 86:(E. Suppl.):E1–E9.
- Ray B.; Bhunia, A. Fundamentos de microbiología de los alimentos. 4ª edición. Mc Graw Hill.
- Sánchez, L.; Gálvez C.; Montañó R. 2011. Guía para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos. Secretaría de Salud. México.
- Secretaría de Salud. NOM-091-SSA1-1994. Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. México. Publicada en el D.O.F. en noviembre de 1995.
- Secretaría de Salud. NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. México. Publicada en el D.O.F. en diciembre de 1995.
- Secretaría de Salud. NOM-111-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. México. Publicada en el D.O.F. en septiembre de 1995.
- Secretaría de Salud. NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. México. Publicada en el D.O.F. en agosto de 1995.
- Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. México. Publicada en el D.O.F. en febrero de 1996.
- Norma Oficial Mexicana NOM-185-SSA1-2002, Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, Productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. México. Publicada en el D.O.F. en octubre de 2002.

- Stabel, J., 2003. Effective Methods for Postharvest Intervention in Dairy Processing. *American Dairy Science Association*. 86:(E. Suppl.):E10–E15.
- Torres, A., Eusebio, M., Avilés, D., 1998. Cuenta de levaduras y mohos en alimentos por la técnica en placa Petrifilm YM y la técnica convencional de cultivo. *Industria alimentaria*, **20** (5), pp25-31
- Sobsey, M.D. Microbial Indicators of Fecal and Other Types of Environmental Contamination. Environmental and Health Microbiology course, Lecture 2. University of North Carolina. 2008. USA. Disponible a través de:
[www.unc.edu/courses/2008spring/envr/421/001/ENVR421_Lecture2_Indicators14_Jan2008\(3\).pptx](http://www.unc.edu/courses/2008spring/envr/421/001/ENVR421_Lecture2_Indicators14_Jan2008(3).pptx)
- UNAVARRA, 2008. Métodos generales de análisis microbiológico de los alimentos III. Detección de microorganismos índices e indicadores. Portal de la Universidad de Navarra. España. Disponible a través de Internet en:<http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/13-deteccion%20de%20indicadores%20e%20indices.htm> [Último acceso el 17 de octubre de 2011].
- Walpole, R y Myers R. Probabilidad y estadística. Editorial McGraw-Hill. México 1992 . Pp 299-314.
- 3M. 2004. Placas Petrifilm para el recuento de Mohos y levaduras. Guía de interpretación. Microbiología 3M. México.

Anexos

Anexo I Definiciones

Muestras pareadas: significa que los datos de ambos tratamientos se van obteniendo por pares, de forma que cada par son datos que tienen algo en común.

Valor crítico: es el número que se lee en tablas de la distribución de referencia, y se puede pensar como el número que separa las regiones de aceptación y de rechazo.

Matriz: es la muestra de alimento en la que potencialmente se encuentra el analito.

Analito: componente medido por el método de análisis, puede ser un microorganismo o un grupo microbiano.

Anexo II Recuento microscópico directo de esporas

Para estandarizar el cultivo de *Penicillium sp.* se dejó crecer al hongo durante 7 días en un tubo que contenía agar Sabouraud, a este tubo se agregaron 10 mL de SSI, para recolectar la mayor cantidad de esporas se raspó suavemente la superficie del hongo con la punta de la pipeta. Esta suspensión se transfirió a un tubo de 16x150 mm con tapón de rosca y se homogeneizó con vórtex, de esta suspensión se tomaron 50 μ L que fueron colocados en un portaobjetos, posteriormente se cubrió con un cubreobjetos con cuidado para evitar la formación de burbujas.

La preparación se observó al microscopio y se contó el número de esporas por campo teniendo mínimo 10 campos. Se promediaron y se obtuvo el número de esporas por unidad de volumen. Si es necesario se hacen diluciones conocidas de la cosecha de esporas, para poder contar y establecer la densidad en la suspensión original.

A continuación se ejemplifica el método de recuento microscópico directo.

Se tomaron 40 µL de la suspensión de esporas que se observaron al microscopio, se contaron 10 campos del microscopio y se obtuvo lo siguiente:

campo	no. de esporas
1	60
2	37
3	39
4	33
5	44

campo	no. de esporas
6	59
7	59
8	66
9	69
10	76
promedio	54

*Con un portaobjetos micrométrico graduado se obtuvo el diámetro del campo del microscopio.

Diámetro del campo: 180 µm

∴ Radio del campo: 90 µm

Área del campo: $3.1416 \times (90)^2$

$$: 2.5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$$

*Largo del cubreobjetos: 1.8 cm ó $1.8 \times 10^4 \mu\text{m}$

*Área del cubreobjetos: $(1.8 \times 10^4) (1.8 \times 10^4)$

$$: 3.24 \times 10^8 \mu\text{m}^2$$

Dividimos el área del cubreobjetos entre el área del campo del microscopio para saber cuántos campos tenemos en total en el cubreobjetos.

$$\frac{3.24 \times 10^8 \mu\text{m}^2}{2.5 \times 10^4 \mu\text{m}^2} = 1.3 \times 10^4 \text{ campos}$$

Con este número de campos podemos saber cuántas esporas tenemos en todo el cubreobjetos, lo que corresponde a los 40 µL de la suspensión de esporas:

1 campo → 54 esporas

1.3×10^4 campos → **$x = 7.05 \times 10^5$ esporas**

Así tenemos que:

40 µL → 7.05×10^5 esporas

1000 µL → **1.8×10^8 esporas**

Se hacen las diluciones decimales necesarias para tener 25 esporas/mL.